



Estudo da Evolução dos Compostos da Uva ao Longo da Maturação em Clima Semi-Árido

Castas Carbenet Sauvignon, Aragonez e Alicante Bouschet

Filipa de Oliveira Neves Tomaz

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Viticultura e Enologia

Orientador: Licenciada Olga Maria Carrasqueira Laureano

Júri:

Presidente: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais Licenciada Olga Maria Carrasqueira Laureano, Investigadora Coordenadora do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Raul da Fonseca Fernandes Jorge, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2013

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

À Professora Olga Laureano pela enorme paciência que teve comigo, durante todo este trabalho.

À Dona Graziela a disponibilidade e ajuda que me deu em toda a parte prática.

À Carolina e ao Frederico pela companhia e boa disposição nos momentos de escrita.

Aos meus Pais, à Maria e à Isabel pelo apoio e por estarem sempre presentes.

Resumo:

Este trabalho pretendeu estudar a evolução das várias características do mosto, partindo de amostras provenientes de vinhas na região do rio São Francisco, Brasil que se encontram em diferentes estados de maturação. Foram retiradas amostras de quatro talhões diferentes que foram podados em diferentes datas, das castas Cabernet Sauvignon, Aragonez e Alicante Bouschet.

Antes de analisar as amostras foram avaliados dois tipos de análise diferentes referentes a precursores de aromas, taninos, antocianas e índices de fenóis totais, sendo no final escolhido o método Carboneau como método de extracção dos compostos de forma a ser feita a leitura dos mesmos posteriormente. Para além destas características foram analisados: açúcares, ácido málico, ácido tartárico e acidez total, para complementar o estudo de cada amostra.

Pode observar-se que muitas das alterações na evolução de maturação foram causadas pelo factor clima, e que quanto maior fosse o estado de maturação mais este factor interferia. Devemos também ter em conta que os talhões tinham diferenças a nível de técnicas vitícolas como sistemas de condução, clones e porta-enxertos que demonstraram também interferir nos resultados das amostras.

Palavras-chave:

Vinhos Brasileiros; Clima semi-árido; Maturação das uvas; Método Carboneau.

Abstract:

This work aims to study the evolution of the various characteristics of wine, using with samples from vineyards in the region of the São Francisco Valley, Brazil that are in different states of maturation. Samples were taken from four different plots that were pruned at different dates, from Cabernet Sauvignon, Aragonez and Alicante Bouschet varieties.

Before analyzing the samples, two different types of analysis were evaluated concerning the precursors of aromas, tannins and anthocyanins levels of total phenolic contents. At the end the Carbonneau method was chosen for the extraction of compounds and in order to study them after. To complement the analysis of each sample the following characteristics were also analyzed: sugars, malic acid, tartaric acid and total acidity.

The study shows that many of the changes in the evolution of aging are due to the weather, and that the greater the degree of maturity the further the weather is an interfering factor. We must also bear in mind that the plots had differences in viticultural practices, and it was demonstrated that driving systems, clones and rootstocks also interfere with the results of the samples.

Keywords:

Brazilian Wines; Semi-arid climate; Grapes ripening; Carbonneau method.

Extended Abstract:

This work aims to study the evolution of the various characteristics of wine, using with samples from vineyards in the region of the São Francisco Valley, Brazil that are in different states of maturation. Samples were taken from four different plots (802, 803, 804, 805) which are pruned at different dates. The plots 802, 803 and 805 contain, respectively, Cabernet Sauvignon, Aragonez and Alicante Bouschet, while the 804 batch contains all the mentioned three varieties (this being an experimental plot).

The process of maturation includes a set of physical and biochemical reactions which begins and ends with the painter to ripe grapes, this means when it reaches a balance between various components such as sugars, pH, total acidity ac. Tartaric, ac. Malic, IFT, tannins, etc.. To be used as fruit or to make wine (Gonzalez-Sanjosé MB, 1991) (Palacios, 1986). For oenological proposes the maturation process will determine the quality of the grape, hence the timing of the harvest (at which point we consider the ripe grape) is an important factor in the production of quality wines (Du-Plessis, 1984).

During the maturation process each component evolves differently and influenced by genetic, climatic, geographic and cultural practices used (Andrades, 1995) (Esteban, 2001) (Jonnes, 2000) (Perez-Magariño SG-S., 2002) (Gonzalez-Sanjosé MD, 1993).

According to Jackson and Lombard (1993), high temperatures accelerate the growth and maturation and result in berries with higher soluble solids, high pH, low acidity and low content of anthocyanins and flavor precursors. Also given the same authors cold nights, associated with elevated temperature during the day, the pH and reduce degradation of organic acids when compared to areas of cultivation with hot days and nights. Being the thermal amplitude between day and night a relevant issue.

The amount of water present in the soil affects the quality of grapes and the wines (Conradie et. Al, 2002). (Jackson & Cherry, 1988) it is also demonstrated that in regions with abundant rainfall, the capacity of grape ripening is quite low compared with the initially planned only from thermal indices. It was observed that in temperate regions that do not suffer from floods, the water deficit works in favor of organoleptic quality of wine (Huglin and Schneider, 1998) (Tonietto & Carbonneau, 2004).

With proper cultivation techniques, winemakers San Francisco Valley can produce grapes and wine at any time of the year, allowing an average of 2.5 products per year and most advantageous time for the harvest, but the rainy season is avoided because it is more conducive to disease and poor quality grapes (Teixeira et al, 2007).

Regions in the State of Minas Gerais follows the principle that fine wines are produced in where the grape harvest is done in dry periods and with mild temperatures and contrasting between days and nights, and there is a zero vegetation ($\pm 10^{\circ}\text{C}$), above which the vine can produce grapes all year round and thus the cycle is defined according to the pruning (Regina et al., 2006). There is a rapid degradation of the acidity of the grapes grown in the summer cycle, especially in the first few weeks of ripening, depending on the period of higher temperatures, however the ripening period is longer during the winter cycle, and present content of the grapes soluble solids significantly higher than those produced in summer cycle (R. et al. 2006).

Before analyzing the samples were evaluated two different types of analysis concerning the precursors of aromas, tannins, anthocyanins, and total phenolic contents in order to determine which analysis could combine best practice and reliable results. To analyze the concentration of anthocyanins were tested using two different methods previously described: Carbonneau method and Roggero method. To analyze the concentration of flavor precursors were tested using two different methods previously described: GG method and classic method Carbonneau completed by a part of GG. To analyze the fraction procianidica, we tested two different methods described above: Brouzeix completed thiolysis method and method Carbonneau also completed with thiolysis. For all these factors was the chosen method Carbonneau.

In addition to the mentioned characteristics were analyzed: sugars, pH, total acidity, malic acid and tartaric acid to complement the study of each sample.

The objectives of this study were not fully achieved because the sampling was initially scheduled unable for reasons of weather, and the universe of samples much lower than expected, and also the reason responsible for the alteration of some expected results.

However can be considered likely cause of these alterations are not expected, the climate factor which decreased the rate and capacity for maturation and also the higher the ripeness greater the effect caused by the same factor. It should also be noted that the plots were differences in vine techniques as clones and rootstock have also shown that interfere with the results of the samples analyzed and especially the different conduction systems: ascending monoplane and monoplane retombante, as the monoplane retombante protects the plant from more sun exposure and in this region with temperatures so high could be an advantage.

INDICE

RESUMO:	2
RESUMO (INGLÊS):	4
1 - PESQUISA BIBLIOGRAFICA	8
1.1 - EVOLUÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS DA UVA	8
1.1.1 - Evolução de ácidos e açúcares	9
1.1.2 - Evolução de precursores de aromas	12
1.1.3 - Evolução de compostos fenólicos	13
1.2 - INFLUÊNCIA DO CLIMA NA MATURAÇÃO DA UVA	22
1.2.1 - Viticultura semi-árida	27
3 - MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 - MATERIAL	30
3.2 - MÉTODOS	32
3.2.1 – Métodos de Extração	32
3.2.2 - Método de preparação de amostra para leitura de FT e antocianas	33
3.2.3 - Método de análise de precursores de aromas	33
3.2.4 - Percentagem de álcool provável	36
3.2.5 - pH	36
3.2.6- Acidez Total	36
3.2.7 - Acido Málico	36
3.2.8 - Acido Tartárico	37
3.2.9 - Compostos fenolicos totais	37
3.2.10 - Antocianas totais	37
3.2.11 - Taninos	37
4 - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS	39
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6 - CONCLUSÃO	57
BIBLIOGRAFIA	58
ANEXO 1	71
ANEXO 2	73
ANEXO 3	74
ANEXO 4	75
ANEXO 5	78
ANEXO 6	79

Índice de quadros e gráficos

Quadro 1 - Resumo de características vitícolas de cada talhão analisado.....	31
Quadro 2 - Datas de Poda, Pintor e previsão de vindima de cada talhão analisado	30
Quadro 3 - Características das procianidinas das diferentes castas	56
Imagem 1 - Teor de antocianinas extraídas com o método Carboneau e o método Roggero	39
Imagem 2 - Teor de prec. de aromas extraídos com método tradicional e o método Carboneau.....	40
Imagem 3 - Teor da fracção procianídica extraídos com o método Carboneau e o método Brouzeix.	41
Imagem 4 - Evolução de pH e Ac. Total - casta Cabernet Sauvignon	42
Imagem 5 - Evolução de pH e Ac. Total - casta Aragonez	43
Imagem 6 - Evolução de pH e Ac. Total - casta Alicante Bouschet	44
Imagem 7 - Evolução de Ac. Málico e Ac. Tartárico - casta Cabernet Sauvignon	45
Imagem 8 - Evolução de Ac. Málico e Ac. Tartárico - casta Aragonez.....	46
Imagem 9 - Evolução de Ac. Málico e Ac. Tartárico - casta Alicante Bouschet.....	47
Imagem 10 - Evolução de açúcares - casta Cabernet Sauvignon	48
Imagem 11 - Evolução de açúcares - casta Aragonez.....	48
Imagem 12 - Evolução de açúcares - casta Alicante Bouschet.....	49
Imagem 13 - Evolução de Índice de fenóis totais e Antocianinas - casta Cabernet Sauvignon	50
Imagem 14 - Evolução de Índice de fenóis totais e Antocianinas - casta Aragonez	50
Imagem 15 - Evolução de Índice de fenóis totais e Antocianinas - casta Alicante Bouschet.....	51
Imagem 16 - Evolução de precursores de aromas - Cabernet Sauvignon.....	51
Imagem 17 - Evolução de precursores de aromas - casta Aragonez.....	52
Imagem 18 - Evolução de precursores de aromas - casta Alicante Bouschet.....	53
Imagem 19 - Evolução da fracção procianídica - casta Cabernet Sauvignon	53
Imagem 20 - Evolução da fracção procianídica - casta Aragonez	54
Imagem 21 - Evolução da fracção procianídica - casta Alicante Bouschet	54

1 - PESQUISA BIBLIOGRAFICA

1.1 - Evolução dos principais compostos da uva

O processo de maturação das uvas inclui um conjunto de reacções físicas e bioquímicas, que começa no pintor e acaba com a uva madura, ou seja, quando esta atinge o potencial máximo de cada componente, para ser sujeita a transformações enológicas ou consumo (González-Sanjosé M. B., 1991) (Palacios, 1986).

As transformações que ocorrem nas uvas durante a maturação não ocorrem simultaneamente. De forma geral podemos distinguir vários estados diferentes de óptimos de maturação que não costumam coincidir no tempo, são esses; maturidade fisiológica (germinação), industrial (quando atinge maior peso e concentração em açúcar sem decréscimo dos ácidos) e tecnológica (quando atinge as características óptimas para o seu destino final tendo em conta o tipo de vinho que se deseja produzir). (Perez-Magariño S. G.-S., 2006) (Robredo, 1991).

Tradicionalmente só a maturação industrial era tida em conta (Perez-Magariño, 2006), no entanto, hoje em dia os enólogos procuram também outras características nas uvas, tais como compostos fenólicos e terpénicos.

Esta mudança de mentalidade deve-se à convicção que apenas uvas com altos e equilibrados índices de fenóis podem produzir vinhos tintos de qualidade (González-Sanjosé, 1991); (Peynaud, 1989).

Por estas razões o processo de maturação vai determinar a qualidade da uva, daí que o momento da vindima seja um importante factor na produção de vinhos com qualidade (Du-Plessis, 1984).

Ao crescimento celular verificado durante a maturação associa-se uma diminuição da intensidade respiratória bem como um aumento da actividade de certas enzimas. Este período dura 35 a 55 dias após o pintor (Ribéreau-Gayon P. G., 1986).

As alterações inerentes a este processo não ocorrem em simultâneo, sendo que cada componente evolui de forma diferente e influenciados por factores genéticos, climáticos,

geográficos e as práticas culturais utilizadas (Andrades, 1995) (Esteban, 2001) (Jonnes, 2000) (Perez-Magariño, 2002) (González-Sanjosé M. D., 1993).

1.1.1 - Evolução de ácidos e açúcares

1.1.1.1 - pH

O pH dá-nos uma indicação da concentração de iões H^+ presentes no vinho. É factor chave, já que contribui para a estabilidade microbiológica e físico-química (casses orgânicas e minerais), impedindo o desenvolvimento de microrganismos enquanto aumenta o comportamento antisséptico do dióxido de enxofre e afectando a solubilidade dos tartaratos (Ribéreau-Gayon *et al*, 2001). Por outro lado, é importante a determinação deste parâmetro uma vez que este pode, futuramente, afectar alguns tratamentos efectuados sobre o vinho como, por exemplo, as colagens proteicas (Curvelo-Garcia, 1988), aplicações de dióxido de enxofre (Colette, 1997), entre outros.

O pH do vinho depende muito da riqueza em ácido tartárico (aquele que mais iões H^+ liberta) (Peynaud, 1989), e também dos restantes ácidos presentes na uva, por esta razão é fácil deduzir que os valores deste factor vão crescendo com a maturação da uva, existindo factores que podem diminuir ou aumentar esta tendência, como a questão de solos férteis que tendem a manter baixos valores de pH ao longo da maturação (Cardoso, 2007).

Os valores de pH da uva no momento de vindima têm implicações já referidas anteriormente, como estabilidade microbiológica, físico-química e a nível de tratamentos enológicos, no mosto assim como no vinho resultante.

Referente à cor, quando o pH dos vinhos sobe as antocianas perdem a sua cor encarnada e começa a esbater e de acordo com Singleton em 1987 vinhos com pH superior a 3,9 são mais susceptíveis a oxidações e a perderem a sua cor jovem.

1.1.1.2 - Ac. Total

A acidez nos vinhos e uvas deve-se principalmente a três ácidos, ácido tartárico, ácido málico e ácido cítrico, no entanto existem também ácidos fenólicos.

Os principais ácidos inorgânicos presentes no vinho são carbónico e sulfuroso. Ambos actuam como gases dissolvidos, CO_2 e SO_2 , desta forma não tem especial importância no que se refere ao pH.

Acidez no vinho é frequentemente dividida entre duas categorias, volátil e fixa.

Acidez volátil refere-se aos ácidos que podem ser removidos através de destilação, acidez fixa inclui os ácidos pouco voláteis e o ácido tartárico e o málico constituem mais de 90% do seu valor (estes dois ácidos também são os principais responsáveis pela composição ácida do vinho). Acidez total é a combinação destas duas categorias.

Ácidos orgânicos são de grande importância na composição, estabilização e qualidade organoléptica dos vinhos (Ribéreau-Gayon, 1982), as suas propriedades de conservação também contribuem para a estabilidade físico-química e microbiológica.

Num determinado ano, a acidez total e composição ácida de um determinado mosto depende principalmente das condições geográficas, do solo, clima, principalmente da humidade e permeabilidade do solo assim como precipitação e temperaturas ao longo da maturação (Ribéreau-Gayon et al, 2006). No entanto o mesmo autor refere que independente do clima, os viticultores e enólogos podem ter algum controlo sobre a acidez total através de operações na vinha durante a maturação e também decisão sobre a data de vindima.

Durante a maturação verifica-se uma descida no teor dos ácidos orgânicos nomeadamente do ácido tartárico e do ácido málico, uma das razões para este acontecimento é o facto de estes ácidos servirem de substrato para a respiração. Este fenómeno acentua-se com a temperatura, assim a acidez das uvas maduras é mais fraca nos anos de Verão quente (Reynier, 1986).

Dependendo das condições climáticas e técnicas de vindima das uvas, a acidez fixa pode variar desde valores abaixo de 2g/L, até mais de 5g/L. Durante a fermentação maloláctica, o ácido málico é transformado em ácido láctico que tem características sensoriais menos agressivas. Embora a fermentação maloláctica aumente a variedade química presente no vinho, esta tem pouco efeito sobre a acidez total.

Vinhos tintos são estáveis com acidez baixa, devido a presença de fenóis que realça a acidez e ajuda a manter a estabilidade ao longo do envelhecimento (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

1.1.1.3 - Ac. Málico

Este ácido encontra-se presente em todos os organismos vivos e, como é óbvio, nas uvas. De facto o sumo proveniente de uvas verdes, antes da mudança de cor, pode apresentar concentrações até 25g/L, que desce para menos de metade nas duas semanas antes desta mudança, muito devido à diluição inerente ao crescimento da própria uva, bem como à degradação. O ácido málico constitui assim cerca de metade da acidez total das uvas e vinho (Jackson R. S., 2008).

O ácido málico é sintetizado nos tecidos clorofilinos da planta e é armazenado para ser degradado em momentos de carência energética, verificando-se uma descida acentuada deste ácido após o pintor, associado a uma diminuição da intensidade respiratória da planta (Navarre, 1997). Poderá também ocorrer uma transformação do ácido málico em açúcares através da gluconeogénese, que conduz a uma diminuição deste ácido (Reynier, 1986).

O facto da sua concentração diminuir ao longo da maturação e especialmente em condições de temperaturas elevadas pode levar a produção de um vinho susceptível a ataques microbiológicos e com fraca qualidade (Jackson R. S., 2008).

A quantidade de ácido málico no mosto está directamente relacionado com a temperatura, em vinhas sujeitas a climas frios tem mais tendência para se manter, enquanto em regiões quentes é eliminado por combustão nas uvas (Ribéreau-Gayon et al, 2006). Durante a maturação, os mostos das regiões vitivinícolas do norte ainda contém entre 4 a 6,5 g/L de ácido málico, enquanto na região sul as concentrações são de apenas 1- 2g/L.

1.1.1.4 - Ac. Tartárico

Ao contrário do ácido málico, o tartárico não está muito presente na natureza, é específico das uvas, sendo considerado relativamente forte daí que o vinho apresente um pH na ordem de 3.0-3.5.

A acumulação de ácido tartárico dá-se durante a fase de crescimento herbáceo e provem da decomposição das hexoses ao nível da ligação dos carbonos C4 e C5 (Navarre, 1997). Durante a fase de maturação o teor deste ácido permanece relativamente constante no entanto devido ao aumento do volume da uva a proporção de ácido tartárico diminui (Ribéreau-Gayon, 1986).

O ácido tartárico decresce a sua concentração ao longo da maturação das uvas, mas de uma forma não tão demarcada como o ácido málico e tem também a vantagem de ser

apenas metabolizado por alguns microrganismos, por essas razões tem uma enorme importância em relação ao pH e também durante a fermentação alcoólica (na qual também pode ser adicionado para aumentar acidez do mosto/vinho) (Jackson, 2008).

Este ácido é um dos que mais prevalece nas uvas e vinho. De facto, no fim do crescimento vegetativo, as uvas chegam a atingir concentrações de 15g/L. Nas vinhas situadas mais a norte, o mosto apresenta com alguma frequência valores acima de 6g/L, ao passo que nas vinhas mais a Sul verificaram-se valores abaixo de 2-3 g/L, já que a sua degradação é maior quando os cachos são sujeitos a maiores temperaturas.

1.1.1.5 - Açúcares

No fim de maturação as uvas podem conter entre 15 a 25% de açúcares, compostos de glicose e de frutose, que mais tarde vão fermentar dando origem ao álcool presente no vinho, contém ainda uma pequena quantidade de açúcares que não participam na fermentação alcoólica, em parte condensados constituídos por pentoses (Peynaud, 1989).

No pintor o açúcar presente nas uvas é glucose, porem ao longo da maturação a relação glucose/frutose diminui para um valor ligeiramente inferior a 1 (Cardoso, 2007).

O teor em açúcares aumenta regularmente durante a maturação, fixando-se em valores que dependem das condições genéticas, do solo, do porta-enxerto, alimentação, presença de água disponível para a planta e técnicas culturais (Ribéreau-Gayon et al, 1972). No caso de solos férteis atrasa a maturação de açúcares (Cardoso, 2007) assim como zonas mais frias e chuvosas (Ribéreau-Gayon et al, 1972).

1.1.2 - Evolução de precursores de aromas

Os precursores aromáticos são descritos como compostos não voláteis da uva que mais tarde irão ter relação com o aroma varietal do vinho. Estes compostos sem odor são susceptíveis de se transformarem, em compostos de voláteis de aroma varietal, durante os vários processos biotecnológicos que a uva atravessa desde da vindima até ao engarrafamento (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Estes compostos pertencem a diferentes grupos, são eles: lípidos insaturados, ácidos fenólicos, carotenoides, conjugados de cisteína, de glucose e de metilmetionina (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Em relação aos ácidos gordos insaturados (ácido linoleico e linolénico) assim como os ácidos fenólicos diminuem com a maturação (Bayonove, 2009), no entanto os primeiros não dependem da casta ao contrário dos ácidos fenólicos (Ribéreau-Gayon, 1965).

Os carotenoides também decrescem desde o pintor até a vindima e no entanto apresentam derivados que aumentam neste período (Pinto, 2002), mas a quantidade presente depende muito dos factores climáticos, práticas culturais, casta e clone (Bureau, 1998) (Marais et al, 2009) (Razungles et al, 1987). Estão presentes principalmente nas folhas, nos bagos a sua presença é maior na película e muito diminuta no mosto assim como no vinho, excepto em vinhos fortificados como vinho do porto (Guedes de Pinho et al, 2001).

Os compostos terpénicos libertam por hidrólise enzimática os terpenois que são compostos aromáticos de grande importância por contribuírem largamente para o potencial aromático da uva, são formados a partir da glucose e tendem a aumentar durante a maturação. As formas combinadas de heterósidos terpénicos, já existentes em pequena quantidade antes do pintor, tendem a ocorrer em maiores quantidades ao longo da maturação do que as formas livres (Pinto, 2002). Alguns destes metabolitos estão associados ao casta mas a sua presença e quantidade também depende de factores como, clima, “terroir”, solo e práticas vitícolas (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

A maioria das *Vitis Vinifera* utilizadas na produção de vinhos não têm nenhum aroma característico demonstrado logo nas uvas, com algumas excepções como Muscat e Cabernet Sauvignon (Bayonove, 2009). Contudo ao longo da vinificação vão desenvolvendo os seus compostos e vão reagindo de diferentes formas a transformar o potencial existente nas uvas em aromas que ficam presentes no vinho.

1.1.3 - Evolução de compostos fenólicos

Os polifenóis estão distribuídos em todo o reino das plantas onde são os metabolitos secundários mais abundantes (Macheix, 1990). Apresentam-se sob várias formas, desde ácidos fenólicos, antocianinas a flavonóis simples e complexos.

Segundo Jackson (2008) os fenóis são compostos por ciclos benzénicos ligados a um ou mais grupos hidróxilos associados directamente à estrutura do anel e que, embora possuam também grupos álcool não exibem as suas propriedades.

Os fenóis podem subdividir-se em dois grandes grupos, os não flavonoides e flavonoides, os primeiros são caracterizados por se apresentarem sob a forma de ácidos (Jackson,

2008), sendo os mais comuns nas uvas os ácidos cinâmicos, como ácido cumárico, ácido cafeico e ácido ferrulico (Macheix, 1990). Quanto aos flavonoides são constituídos por um esqueleto C6 - C3 - C6 em dois anéis ligados por um heterociclo oxigenado central (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

Nas uvas os compostos fenólicos presentes são os flavonoides e não flavonóides e segundo Singleton (1980) são o terceiro composto mais abundante. No caso dos flavonoides as classes mais abundantes são Flavanois, antocianinas e flavonois, enquanto na classe dos não flavonoides encontram-se os hidrocínamicos (Corrales, 2009), ácidos fenólicos são o grupo maioritário dos compostos fenólicos não flavonóides, contendo uma função fenólica e uma função ácida (Navarre, 1997).

Considera-se que os fenóis flavonoides dividem-se em flavonois, flavanóis e antocianinas, sendo que esta é ligeiramente diferente das anteriores por ter o heterociclo central insaturado (Ribéreau-Gayon et al, 2006). Os flavanóis incluem flavan-3-óis como a catequina, epicatequina, os seus polímeros e as suas formas esterificadas com galhato ou glucose (Macheix, 1990).

Os compostos fenólicos são encontrados, principalmente, nas camadas internas da película e da grainha, na polpa as suas concentrações são muito baixas, no entanto estes valores dependem muito da casta e dos factores ambientais (Perez-Magariño, 2006).

Estes compostos existem em estruturas insolúveis como vacuolos das células das plantas e em vesículas de lipoproteínas o que complica a sua extracção (Corrales, 2008).

Nas uvas os flavonoides são sintetizados no retículo endoplasmático e de seguida são deslocados e armazenados nos vacuolos das células produtoras. Presume-se que a função dos flavonoides nas uvas é de protecção contra micróbios, insectos e herbívoros.

Nas grainhas os polifenóis decrescem drasticamente durante a maturação com 90% de decréscimo nos monómeros flavan-3-ol e 60% de decréscimo nas procianidinas (Kennedy, 2000).

Nas grainhas podemos encontrar os principais polifenóis de baixo peso molecular em concentrações entre 55,1 e 964 mg por 100g de amostra (sementes) sendo em média 380mg por 100g de sementes. O principal constituinte polifenólico presente nas sementes é a catequina representando 49,8% do conteúdo total em polifenóis, seguido por epicatequina (26,0%), epigallocatequina (9,3%) e procianidinas B1 (5,8%) e B2 (5,1%), sendo epigallocatequina galato e ácido gálico os constituintes com menor presença (Guendez et al, 2005).

Flavonoides são primeiro sintetizados na película e nas grainhas (Jackson, 2008).

A acumulação de compostos fenólicos na película ocorre principalmente na primeira semana de vindima (na primeira data indicada) sem diferenças significativas durante a segunda e a terceira data de vindima indicada (Pérez-Magariño & González-San José, 2006). Foi observado que vinhos de uvas vindimadas na segunda semana tinham a cor mais escura, coincidindo com o valor mais alto de compostos fenólicos no vinho (Pérez-Magariño & González-San José, 2006).

Os compostos fenólicos não evoluem da mesma forma que os açúcares, isto significa que o máximo de concentração de compostos fenólicos não coincide com a acumulação máxima de açúcares presentes na uva (Maujean et al., 1983). Normalmente a presença de compostos fenólicos nas uvas aumenta ao longo da maturação, contudo esta evolução decorre de forma diferente, dependendo das famílias fenólicas (González-San José, 1991) (Mazza et al, 1999) (Pérez-Magariño & González-San José, 2006).

A concentração dos compostos fenólicos totais aumenta continuamente desde o início do desenvolvimento da uva, mas o aumento maior é verificado no início do desenvolvimento dos bagos, sendo acumulação durante a maturação mais lenta (Pinto, 2002).

Nas vias metabólicas de formação de ácido cinâmico e outros compostos fenólicos está presente uma enzima, de seu nome fenilalanina-amoníaco-liase. Esta enzima está localizada nas células epidérmicas da uva assim como nas grainhas e apresenta um máximo de actividade nas grainhas durante a fase de crescimento herbáceo, decrescendo depois do pintor tendo uma actividade muito baixa ao longo da maturação. Nas películas a actividade da fenilalanina-amoníaco-liase é muito elevada no início do desenvolvimento da uva, diminuindo depois até ao pintor. Nas castas tintas a actividade desta enzima aumenta de novo no pintor e existe uma forte relação entre a sua actividade e a intensidade da cor (Hrazdina et al, 1984), (Pinto, 2002), (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

Outra das enzimas presentes nas reacções de metabólicas para produção de compostos fenólicos é a chalcona sintetase, a primeira enzima específica da via de síntese dos flavanoides (condensação dos dois ciclos) aumenta muito no início do pintor, diminuindo de seguida rapidamente (Pinto, 2002).

Segundo Ribéreau-Gayon (2006) a maturação fenólica não depende só da concentração das substâncias desta família, mas também da estrutura e capacidade com que se conseguem extrair das uvas durante a vinificação. Por outras palavras, a maturação fenólica significa em simultâneo uma alta concentração de compostos fenólicos e grande facilidade de extracção destas substâncias (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

Analisar os compostos fenólicos implica a extracção destes das várias partes da uva, o que dificulta esta acção é a grande diversidade e a grande instabilidade dos compostos (Muñoz, 2008).

A extracção dos compostos fenólicos, ou extractibilidade pode variar conforme de acordo com as condições de maturação e a casta (Glories, 1998). A extracção de flavonoides é muito influenciado por pH, sulfuroso e etanol presente no mosto assim como a temperatura e duração de fermentação (Jackson, 2008).

Os compostos fenólicos da uva são responsáveis pela cor, flavour, corpo e estrutura dos vinhos tintos.

Nos vinhos tintos a estabilidade é atingida a com uma menor acidez (comparando com vinhos brancos), graças a presença de fenois reforçam a acidez e ajudam a manter a estabilidade ao longo do envelhecimento (Ribéreau-Gayon, 1986).

Na produção de vinhos tintos é necessário ter em conta a maturação fenólica das uvas, através da determinação da concentração de compostos fenólicos, bem como a sua extratibilidade durante a vinificação (Susana Río Segade, 2008), já que são estes compostos que conferem ao vinho atributos sensoriais como a estrutura, acidez, adstringência e cor (Escribano - Bailon, 2001), o que permite ao enólogo explorar o máximo potencial da uva (Cheynier V., 1990) (Cheynier, 1997) (Gerbi, 2002).

Experiencia nas adegas demonstram que os vinhos com cor mais estável e com maior e mais intensa roxa são obtidas utilizando as uvas mais maduras, este facto deve ser correlacionado com as mudanças que ocorrem na composição fenólica durante as ultimas fases de maturação (Andrades, 1995) (Esteban, 2001) (Jonnes, 2000) (Robredo, 1991).

A maturação tecnológica, aromática e fenólica são variáveis independentes e todas devem ser tidas em conta para chegar a uma conclusão sobre a melhor momento para vindimar conseguindo assim a maior qualidade possível do vinho a produzir (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

1.1.3.1 - Taninos

Existem várias definições de taninos, e segundo Harborne (2000) podemos definir os taninos como compostos fenólicos naturais disseminados por variadíssimas espécies vegetais, solúveis em água e com capacidade para formar fortes complexos insolúveis com a proteína ou outros nutrientes em solução aquosa, podendo ter efeitos prejudiciais na

alimentação de animais. Estes compostos têm, recentemente, vindo a ser objecto de estudo devido as características antioxidantes que parecem apresentar (Cai, 2006).

A estrutura química dos taninos é formada através da polimerização de moléculas fenólicas (Ferreira, 2006) e podem ser divididos em dois grandes grupos os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis apenas ocorrem nos vinhos quando estes são sujeitos a contacto com materiais vegetais que os possuem, como é o caso da madeira de carvalho (Jordão, 1996), ou seja, não são naturais na uva mas a sua adição é autorizada (através do contacto com a madeira no decurso da vinificação/armazenamento ou através de adição de taninos comerciais) (Ferreira, 2006).

Os taninos condensados conhecidos como proantocianidinas ou ainda flavanois são, em parte, responsáveis pelas características organolepticas das uvas e vinhos como resultado das suas propriedades tanicas, que dependem da sua estrutura e do seu grau de polimerização (Freitas, 1998).

Consideram-se pelo nome proantocianinas, os produtos de polimerização de flavanois (flavan-3-ol), que quando aquecidas e em presença de meio ácido, possuem a propriedade de libertar antocianidinas pela quebra de ligações intermonoméricas (Porter et al, 1986 referido em Ferreira, 2006). Podemos distinguir dois grupos de proantocianidinas segundo a natureza da antocianidina libertada, temos as procianidinas: catequina e epicatequina e os dimeros, assim como o trimero que contem três moléculas de epicatequina (Bourzeix, 1986) que dá origem a cianidina (Ferreira, 2006), por outro lado temos as prodelphinidinas, constituídas por galhocatequina e de epigalhocatequina que dão origem a delphinidina.

A catequina e epicatequina são dois flavonois monoméricos, quando estes dois monómeros se ligam pela posição α ou β das suas estruturas moleculares dão origem a dimeros e estruturas oligoméricas. Estas são ligadas por C4-C8 (Bourzeix, 1986), embora as ligações entre C4-C6 também ocorram. Ambas as estruturas são definidas por procianidinas tipo B (Passos, 2007). As procianidinas tipo B podem aparecer esterificadas por ácido gálico, formando 3-O-galatos através de epicatequinas (Santos-Buelga, 1995), originando esterés, como catequina/epicatequina galhato ou ligando-se a açúcares ou proteínas originando glicosés ou peptídeos (Nawaz, 2006). Para além das ligações C4-C8, previamente referidas, as procianidinas podem também estabelecer ligações duplas de éter C2-C7, dando origem a estruturas do tipo A (Gu, 2003), resultando de uma reacção oxidativa intramolecular (Kondo, 2000).

As procianidinas ocorrem nas partes sólidas do cacho da uva, isto é, no engaço, nas películas e grainhas, onde a concentração de catequinas e procianidinas é maior (Bourzeix,

1986). No caso da polpa a presença é quase nula, excepto em castas tintureiras (sendo aí a sua presença também muito diminuta).

Proantocianinas oligoméricas são uma classe de polifenóis biflavanois que são encontrados com maior concentração nas grainhas e são formadas por dois ou mais monómeros ligados quimicamente. Cinco dímeros diferentes (procianidinas B1, B2, B3, B4 e B5) e dois trímeros (C1 e C2) foram identificados na película e grainhas das uvas (Fuleki T. d., 1997).

Para formas oligoméricas (dímeros e trímeros) Brouzeix concluiu que 38% encontrava-se nas grainhas, 33% nos engaços, 28% nas películas e 1% na polpa, e em relação a formas monoméricas o mesmo estudo demonstrou que 56% encontrava-se nas grainhas, 27% nos engaços e 17% nas películas (Jordão, 1996).

Os taninos presentes nas grainhas localizam-se nos envelopes externos e internos da estrutura das grainhas e apresentam uma maior adstringência. Enquanto nas películas existem três tipos de taninos: taninos localizados nos vacúolos das células (sendo os taninos menos agressivos, com menor reactividade com glico-proteínas da saliva), taninos fortemente ligados a membrana dos vacúolos ou tonoplastos e taninos integrados na parede pectina-celulase (Amrani-Joutei, 1993) (Jordão, 1996).

Enquanto nas películas existem três tipos de taninos: taninos localizados nos vacúolos das células próximas da epiderme, taninos fortemente ligados a membrana proteofolipídica e taninos integrados na parede pectina-celulose (Amrani-Joutei, 1993).

Desde o pintor até a maturação completa os taninos presentes na uva aumentam embora já exista uma concentração bastante elevada durante a mudança de cor da uva (Guilloux, 1981).

Os principais taninos nas grainhas são as procianidinas que têm um baixo grau de polimerização que vai aumentando ao longo da maturação, sendo que os dímeros e trímeros decrescem em 90% desde o pintor até a maturação completa (Freitas, 1995), no entanto o decréscimo torna-se menos acentuado à medida que nos aproximamos das últimas semanas de maturação (Czochanska et al, 1979). Por outro lado, os mesmos autores, referem que as procianidinas B1, B2 e B4 sofreram um contínuo incremento durante a maturação.

Os taninos nas películas são estruturas muito complexas e a variação do seu grau de polimerização é muito baixa. Estas moléculas têm propriedades coloidais que vão diminuindo após o pintor, assim os taninos das películas vão perdendo a agressividade e adstringência ao longo da maturação (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

Este processo varia conforme as condições de maturação, a acumulação de antocianinas nas películas (Darné, 1988) e a casta. Segundo Ferreira (2006) nas películas as proantocianidinas diméricas apresentam elevados valores no início do período de maturação que é seguido de um decréscimo, esta evolução poderá traduzir uma utilização destes compostos na biossíntese de outros fenóis, nomeadamente de outros taninos mais ou menos condensados, este autor também observou ao longo da maturação das uvas um aumento do grau médio de polimerização dos taninos da película. Nas grainhas como já referido anteriormente a concentração de taninos diminui ao longo da maturação tendo uma elevada concentração no início da maturação que vai decrescendo ligeiramente até a maturação completa (Ribéreau-Gayon et al, 2006). Habertson et al, (2004) referido em Sevinato Pinto (2002) demonstra que nas castas Cabernet Sauvignon e Syrah é observado um máximo de taninos nas grainhas antes do pintor, período após o qual se verificou um decréscimo seguido de uma estabilização nas quatro semanas que antecederam a vindima.

Os principais taninos nas grainhas são as procianidinas, que têm um baixo grau de polimerização que vai aumentando ao longo da maturação, sendo que os dímeros e trímeros decrescem em 90% desde o “pintor” até a maturação completa (Freitas, 1995).

Nas grainhas os taninos estão presentes no interior da cutícula e apenas são libertados para o exterior se esta for solubilizada (Geny et al, 2003). Os taninos livres são os mais fáceis de extrair em remontagens e da própria maceração ao longo da vinificação, sendo também os que mais facilmente são “alvo” da acção de enzimas pectolíticas. Os taninos ligados aos tonoplastos, devido a ligação forte entre proteínas (natureza fosfolipídica das membranas dos tonoplastos) e taninos, têm uma extracção mais difícil no decurso da vinificação (Jordão, 1996).

Assim como os restantes compostos fenólicos, os valores de procianidinas presentes nas uvas diferem de casta para casta, do ano de colheita, do tipo de solo, tipo de condução de vinha e das condições climáticas (Dumazert 1973, Romeyer 1986, Dumon 1991, Fernandez de Simon 1992, Ribéreau-Gayon 1980, Moutounet 1996, De Freitas 1995) no entanto as quantidades relativas de cada forma presente nas várias partes do cacho é relativamente semelhante (Ricardo da Silva, 1995).

Em teores globais os taninos variam em função da casta (Ribéreau-Gayon P. G., 1986) (Bourzeix, 1986) com as condições culturais (Souquet et al, 1996) e ainda das condições edafoclimáticas (Goldberg et al, 1998).

Acidez e adstringência são dois dos principais atributos do vinho que são principalmente induzidos por polímeros flavanois (procianinas ou taninos condensados) são os principais

indutores e variam conforme o seu grau de polimerização (Lea, 1990) (Arnold, 1980) e a extensão de galoictização (Arnold, 1980).

A distribuição dos compostos fenólicos na uva é feita de forma desigual, assim, a sua futura presença no vinho será conforme a extração é efectuada na película, polpa ou grainha segundo (Escribano-Bailón, 1992) (Fuleki T. R., 1997) em (Palma, 1999).

Estes compostos estão presentes na película e grainha e são extraídos para o vinho tinto durante a fermentação alcoólica (Fountoin, 2008). As grainhas têm um importante papel na produção de vinho tinto, contribuindo com monómeros flavan-3-ol e procianidinas (chamadas por enólogos como os taninos das grainhas) para o produto final, sendo componentes essenciais para a acidez e adstringência (Kennedy, 2000) falada anteriormente.

1.1.3.2 - Antocianinas

A estrutura das antocianinas difere dos restantes flavonoides pois a sua estrutura é complementada por um ou mais moléculas de glucose (Delgado-Vargas, 2002). As antocianinas mais abundantes nas uvas são as formas glicosidadas de cianinas, malvidinas, delphinidinas (Corrales, 2009).

As antocianinas na forma de heterósidos (antocianinas), são muito mais estáveis do que na forma aglicona (antocianidinas). A sua estrutura, compreende dois anéis benzénicos unidos por um heterociclo oxigenado e cationico, catião flavílio. Distingue-se, uva e no vinho, consoante a substituição do radical lateral, cinco moléculas de antocianidinas definidas, sendo estas: cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina, e malvidina (Ribereau-Gayon et al, 1998).

A sua síntese começa no pintor e vão-se acumulando ao longo da maturação da uva (Cholet, 2004) (Perez-Magarino, 2004). A taxa de acumulação de antocianinas tem sido relacionado com várias condições agro-ambientais, tais como, a cultivar, o clima, as condições do solo, condições de rega e práticas culturais, no entanto pode ocorrer um decréscimo destas mesmo antes da vindima e/ou durante a sobrematuração (Río Segade, 2008).

As antocianinas diferem entre si pelo grau de hidroxilação e/ou metilação do ciclo benzénico B do catião flavílio ou 2-fenilbenzopirílio.

A biossíntese destas moléculas ocorre junto do retículo endoplasmático das células devido à acção de um conjunto de enzimas citoplasmáticas e de outras ligadas ao retículo (Hrazdina, et al, 1984), de seguida são transportadas para os vacúolos das células onde se acumulam.

No pintor as antocianinas aparecem sob as formas monoglucosidas e os respectivos esteres acilados, a esta acumulação deve-se o aparecimento da cor tinta nas uvas (Kelebek, 2006).

A partir da fase de pintor ocorre um importante aumento na quantidade de antocianinas presentes na película dos bagos. No entanto a acumulação inicia-se 2 a 3 semanas antes do início do pintor, antes que a coloração seja visível (Darné, 1988).

Na terceira semana, depois de completa a maturidade, o conteúdo em antocianinas cai, o que pode indicar o começo de pós-maturação e processo de senescência (Andrades, 1995).

A evolução do conteúdo antociânico é caracterizada por 3 fases (Ribéreau-Gayon et al, 2006) (Hrazdina et al, 1984) (Darné, 1988): primeira fase o nível de antocianinas apresenta um ligeiro aumento, segunda fase em que demonstra um crescimento de antocianinas e terceira fase em que se observa uma estabilização seguida de decréscimo até ao fim da maturação tecnológica.

Segundo Piergiovanni e Volonteiro citado em Jordão (1996), mostram que a composição antociânica das uvas, não varia gradualmente ao longo da maturação, mas sim sofre pequenas oscilações, devido ao carácter dinâmico da biossíntese provocado pela variação dos factores que afectam a produção e acumulação destes pigmentos.

Tendo por base o modelo de síntese proposto por Roggereau em pigmentos precursores (cianidina e delphinidina 3-glucósido), pigmentos estáveis (peonidina e malvidina 3-glucósido) e pigmentos intermédios (petunidina 3-glucósido). Assim segundo os seus resultados os pigmentos precursores sofrem um grande incremento na primeira semana após o início do pintor, de seguida sofre um ligeiro decréscimo sendo que no fim da maturação são os compostos antociânicos menos presentes nas uvas. Para o caso das antocianinas estáveis, representantes das últimas formas da cadeia de transformação, aumentam gradualmente até representar a maioria presente.

A antocianina mais abundante nas uvas é a malvidina-3-glucósido, sendo segundo Bakker e Timberlake citados em Jordão (1996) 33 a 60% do total de antocianinas presentes em extracto de películas de 26 castas diferentes presentes na região do Douro. Para além desta podem-se ser encontradas mais 20 compostos diferentes na película da uva (Ribéreau-Gayon, 1986). As principais antocianinas presentes na natureza são: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (Jordão, 1996).

De acordo com Flanzky (1972) as uvas provenientes de 9 castas tintas apresentam um teor médio de antocianinas de 2295mg/kg de uva, encontrando-se 95 a 98% na película e os restantes 2% no engaço. Segundo os mesmos autores castas tintureiras (como Alicante Bouschet) apresenta 77% das antocianinas na película e 22% na polpa.

Note-se que a extracção das antocianinas da película da uva para o vinho depende, não só, da sua concentração na primeira, como também da tendência desta para as libertar (Ortega - Regules, 2006), assim, é destes dois factores que principalmente depende a concentração destes compostos no vinho (Fournand, 2006).

No entanto, em relação à forma como a extratibilidade das antocianinas evolui, existem resultados divergentes. Há estudos que demonstram o aumento desta durante a maturação da uva (Ribéreau-Gayon et al, 2006), ao passo que outros concluem que não existe uma evolução clara quando a acumulação de açúcares na polpa se situa entre 163 e 275 g/L (Fournand, 2006), assim, parece não ser obrigatório que uvas com maior concentração de antocianinas resultem num vinho com mais cor (Río Segade, 2008).

A noção de extratibilidade depende muito do estado de maturação em que as uvas se encontram, pois deste factor vai depender a capacidade de ruptura das películas e assim consequente libertação das antocianinas. Por essa razão, em circunstâncias iguais, quando as uvas estão no momento de vindima ou em sobre-maturação o vinho produzido vai conter um maior quantidade de antocianinas comparando com vinhos produzidos a partir de uvas vindimadas anteriormente, embora estes pigmentos tenham a tendência para diminuir a partir da vindima (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

1.2 - Influência do clima na maturação da uva

Na maturação o clima tem um papel muito importante, sendo que clima inclui diferentes factores como a temperatura, radiação solar, precipitação.

Segundo Jackson e Lombard (1993), temperaturas elevadas aceleram o crescimento e o amadurecimento e resultam em bagas com maior teor de sólidos solúveis, elevado pH, baixa acidez e menor conteúdo de antocianinas e precursores de aroma. Também tendo em conta os mesmos autores as noites frias, associadas a elevada temperatura durante o dia, reduzem o pH e a degradação dos ácidos orgânicos quando comparada a regiões de cultivo com dias e noites quentes. Sendo de apontar que a amplitude térmica entre dia e noite tem uma importância relevante.

Dados obtidos com diferentes cultivares de uvas indicam redução do teor de ácido málico em função, principalmente, da temperatura da baga (Bergqvist et al., 2001; Conde et al., 2007). De acordo com esses autores, à medida que a temperatura aumenta, as necessidades energéticas crescem e, para manter a produção de energia, a célula recorre ao ácido málico armazenado através de um aumento de actividade da enzima málica. Dessa forma, uvas colhidas em regiões frias normalmente são mais ricas em ácido málico do que as de regiões quentes.

Para temperaturas acima de 25°C, a fotossíntese decresce mesmo que seja sujeita a exposição solar (Huglin & Schneider, 1998). Para temperaturas elevadas, acima de 30°C, o tamanho e peso do bago diminui (Hale & Buttrick, 1974) e os processos metabólicos assim como a acumulação de açúcar pode mesmo parar completamente (Combe, 1987); (Kriedemann & Smart, 1971),

Desta forma embora temperaturas altas acelerem a maturação da uva, a acumulação final de açúcares, segundo (Combe, 1987), é relativamente mais baixa. Temperaturas elevadas (30°C) podem levar a uma maior concentração de sólidos, mas os níveis de Brix superiores a 24-25Brix devem-se não a fotossíntese e transporte de açúcar das folhas e ramos, mas sim pela concentração devido às perdas por evapotranspiração (Keller, 2010) (Keller, 2009).

Outro efeito considerável da temperatura incide sobre a acidez total (Combe, 1987); (Tarara et al, 2008). Em relação aos principais ácidos da uva, estes têm diferentes comportamentos perante o factor temperatura, enquanto o ácido tartárico é relativamente estável, o ácido málico varia ligeiramente consoante a temperatura e maturação e diminui com temperaturas elevadas (Buttrick & Hale, 1971; Huglin & Schneider, 1998; Kliewer & Schultz, 1973; Koblet et al, 2010; Ruffner et al, 1976). Acidez baixa é fortemente relacionada com um pH elevado, esta mesma relação é afectada pela acumulação de potássio, que por sua vez depende da temperatura. Os níveis de potássio sobem significativamente nos cachos, especialmente durante a maturação da uva, este facto tem sido correlacionado com redistribuição que vem dos outros órgãos superiores (acima do solo) da planta (Hale, 1977); (Williams & Biscay, 1991). Os efeitos da temperatura na acumulação de potássio nos bagos ainda não está totalmente estudado, mas vários autores tem sugerido que altas temperaturas dão origem a níveis de potássio elevados (Combe, 1987); (Hale, 1988). Temperaturas elevadas aumentam os níveis de potássio e diminuem acidez total, e assim também o pH aumenta. Em climas quentes, pH acima de 4 são facilmente atingidos, mas também já foram registados em climas frios (Sigler, 2010).

Durante ou após vindima e no início do processamento de vinificação, as uvas podem ser danificadas favorecendo a deterioração por microrganismos indígenas que residem nas

películas e equipamento de manuseio, bem como pela oxidação química. Estes processos são promovidos por temperaturas e valores de pH mais altos, o que parece ser cada vez mais frequente devido ao aquecimento global (Cohen et al, 2008).

Para além do açúcar, ácidos e potássio, as altas temperaturas também influenciam a acumulação de outros compostos presentes em menores quantidades mas com muita importância para a cor e aroma do vinho.

Durante o período de maturação, a temperatura do ar tem um papel determinante na maturação da uva, principalmente no aroma e cor, tendo mais tarde importantes efeitos nas características do vinho (Jackson e Lombard 1993). As temperaturas diárias têm muita importância no entanto as temperaturas mais frias da noite têm um efeito igualmente importante (Singleton and Esau, 1969; Kliewer and Torres, 1972; Kliewer, 1973; Tomana et al., 1979; Fregoni and Pezzutto, 2000) sendo que a cor é muito influenciada pelas noites com temperaturas baixas (Tonietto & Carbonneau, 2004). É difícil determinar efeito de uma temperatura específica, visto a radiação solar exercer também um efeito de temperatura. Alguns cachos estão exposto ao sol, o que pode modificar a sua temperatura (diferença de 5-13°C), comparando com cachos na sombra na mesma videira (Huglin & Schneider, 1998; Kliewer & Lider, 1968; Lee et al., 2007; Ryona et al, 2008; Spayd et al, 2002) no entanto são feitos esforços para que esse factor não interfira nos estudos efectuados (Orduña, 2010).

Existem estudos que defendem que em climas quentes, o bago pode chegar a temperaturas demasiado altas que inibem a formação de antocianinas e portanto reduz a cor da uva (Downey et al, 2006). Num recente estudo, (Cohen et al, 2008), demonstrou que a casta Merlot aumentou as taxas de amadurecimento e concentrações de antocianinas no momento de vindima, quando as flutuações das temperaturas diurnas são atenuadas.

A variação de compostos fenólicos nas uvas é bastante significativa e a amplitude desta variação depende da casta (Kliewer & Torres, 1972). O seu papel como protectores fotossintéticos explica a sua dependência da exposição (Caldwell et al, 2007). Contudo a temperatura tem demonstrado ter um papel directo e também importante na formação destes mesmos compostos (Huglin & Schneider, 1998). Enquanto temperaturas baixas (14-9°C dia e noite respectivamente) não conduzem a grandes concentrações de antocianinas (Combe, 1987), temperaturas a partir de 30°C também tem como efeito a diminuição da síntese de antocianinas (Buttrose et al., 1971; Spayd et al., 2002; Tarara et al., 2008), podendo mesmo chegar a ser uma inibição completa e irreversível quando se atingem temperaturas muito elevadas como Kliewer (1977) demonstrou para a casta Emperor em temperaturas de 37°C (independentemente da exposição solar).

Podemos considerar que a radiação solar é o factor que mais influencia a biossíntese e acumulação de antocianinas (Mazza & Miniati, 1993). Segundo Mazza e Miniati (1993) a redução da exposição da videira a radiação solar provoca uma diminuição do nível de antocianinas nos bagos. Outro factor importante correlacionado com a temperatura é a tendência das uvas para inibir a biossíntese quando sujeitas a temperaturas elevadas de dia (35 a 37°C) e de noite (30 a 32°C) (Flora, 1978; Kliwer & Schultz, 1973) sendo que esta correlação pode variar de casta para casta e para diminuir estes efeitos a utilização de rega por aspersão ajuda a reduzir a temperatura a que os bagos estão sujeitos (Kliwer & Schultz, 1973).

Temperaturas elevadas podem resultar numa menor acumulação de antocianinas e variações na composição do vinho. No estudo de Cohen et al (2008) apresentam resultados que propõe uma maior acumulação de unidades mais extensas no pintor, em oposição a subunidades terminais, com o aumento da temperatura. Tratamentos que envolvem o aquecimento dos cachos durante a noite resultam numa maior concentração de subunidades terminais, segundo os mesmos autores, é possível que a taxa de síntese de subunidades terminais atinja um máximo enquanto os valores de flavan-3,4-diois são proporcionais à acumulação de calor ao longo do tempo (Cohen et al, 2008).

Vários estudos demonstraram uma associação positiva entre a temperatura e o número de grainhas, assim como entre temperatura e o total de proantocianinas por bago na vindima (del Rio & Kennedy, 2006; Ewart & Kliwer, 1977). Efeitos similares têm vindo a ser observados em bagos expostos ao sol (Crippen & Morrison, 1986) reiterando a importância de diferenciar entre efeitos da radiação solar e efeitos da temperatura.

As temperaturas elevadas associadas à presença de água no solo durante o período de vegetação e produção, induzem a um desenvolvimento vegetativo vigoroso, levando o crescimento dos ramos a competir com os frutos pelo acúmulo dos carboidratos gerados pela actividade fotossintética e impedindo a maturação completa das uvas, notadamente da maturação fenólica, importante para elaboração de vinhos encorpados e de guarda, além de aumentar a incidência de doenças fúngicas (Guerra, 2001).

Vários estudos mostram que amadurecimento em condições de baixa temperatura nocturna favorece a síntese de antocianinas e precursores de aroma (Jackson; Lombard, 1993; Bergqvist et al., 2001; Spayd et al., 2002; Deloire et al., 2004; Tonietto; Carbonneau, 2004; Mori et al., 2005; Koshita et al., 2006).

Exposição solar é necessária para a acumulação de compostos monoterpénicos, que têm um papel muito importante nos aromas florais, especiarias e de frutos. De acordo com

alguns autores, para as mesmas concentrações de açúcares, temperaturas elevadas têm tendência para diminuir os níveis de aromas varietais em castas brancas (Belancic et al., 1997); (Reynolds & Wardle, 1993) e assim diminuindo drasticamente o potencial aromático. Por outro lado, temperaturas quentes são relacionadas com o aumento da formação 1,1,6-trimetilo-1,2-dihidronaftaleno (TDN), que é responsável por notas de querosene ou petróleo na casta Riesling, assim como outros norisoprenoides C13 (Marais et al, 1992). O limite sensorial das metopirazinas é de uma parte por trilião e a sua acumulação está associada com viticultura em climas frios (Lacey et al, 1991). Temperaturas altas e/ou exposição solar são, por sua vez, correlacionadas, com baixos valores de metopirazinas (Allen & Lacey, 1993; Ryona et al., 2008).

Clima seco influencia a qualidade das uvas em relação ao álcool provável, cor e perfil aromático (Tonietto & Carbonneau, 2004). Sendo que a precipitação (ou quantidade de água disponível) de grande importancia em todos factores referidos anteriormente.

A quantidade de água presente no solo afecta a qualidade da uva e também dos vinhos (Conradie et. al, 2002). (Jackson & Cherry, 1988) demonstraram que em regiões com chuvas abundantes a capacidade de maturação das uvas baixa bastante comparando com a prevista inicialmente apenas a partir de índices térmicos. Foi observado que em regiões temperadas que não sofrem cheias, o défice de água ligeiramente negativo favorável à qualidade organoleptica do vinho (Huglin & Schneider, 1998; Tonietto & Carbonneau, 2004).

O controlo de quantidade de água presente no solo é determinante na obtenção de uvas de qualidade (Seguin, 1983; Méroutte et al., 1998). Bravdo and Hepner (1987) demonstraram que a falta de água melhora a qualidade das uvas, especialmente se for de forma moderada (Carbonneau, 1998).

Para uma mesma concentração de acidez total, o pH é menor em condições de maior disponibilidade hídrica. O valor de pH é dependente, além da acidez total, das concentrações relativas de ácidos málicos e tartárico e do grau de formação de sais ácidos, que, por sua vez, depende do conteúdo de potássio na baga. Pelo contrário condições de défice hídrico favorecem o catabolismo do ácido málico (Esteban et al., 2002).

1.2.1 - Viticultura semi-árida

O conceito de viticultura semi-árida tem sido usado para classificar climas em que as regiões vitícolas têm mais de um ciclo vegetativo natural por ano, diferindo da viticultura clássica onde existe apenas um ciclo vegetativo por ano.

As vinhas presentes em regiões semi-áridas, sujeitas a climas quentes, demonstram um comportamento agronómico bastante diferente daquelas sujeitas a climas temperados. Nestas condições, o inverno típico induz dormência nas uvas, enquanto nas regiões semi-áridas (como no Brasil) os processos fisiológicos são acelerados, permitindo, por exemplo, a primeira produção após 1,5 anos (Teixeira et al, 2007).

De acordo com o estudo efectuado por Tonietto e Carboneau , que tomou como exemplo o vale do Rio de São Francisco, no Brasil, região vitivinícola de Petrolina. (situada a 09 graus de latitude para sul, uma zona climática considerada tropical semi-árida) (Tonietto & Carboneau, 2004), os resultados indicaram três situações distintas: clima muito seco com temperaturas elevadas e noites igualmente quentes, clima húmido com temperaturas elevadas e noites quentes e por fim clima moderadamente seco com temperaturas muito quentes e noites também quentes. Estas condições climáticas descrevem assim a variedade intra-anual às quais as vinhas estão sujeitas em função do período do ano em que os enólogos e viticultores desejarem obter a sua produção.

Com as técnicas culturais apropriadas, os viticultores do vale de São Francisco podem produzir uvas e vinho a qualquer altura do ano, permitindo assim uma média de 2,5 produções por ano e a época mais vantajosa para a vindima, contudo o período das chuvas é evitado pois é mais propício a doenças e uvas de má qualidade (Teixeira et al, 2007).

Nas áreas produtoras tropicais, como o Vale do São Francisco, a falta de amplitude térmica limita a acumulação de polifenóis, e os vinhos tintos elaborados devem ser consumidos jovens devido à sua característica de leveza, estrutura fraca a média e desenvolvimento aromático médio (Tonietto; Carboneau, 1999).

Nas regiões de cultivo no Estado de Minas Gerais segue-se o princípio de que vinhos finos são produzidos em regiões onde a colheita da uva é feita em períodos secos e com temperaturas amenas e contrastantes entre dias e noites, e que existe um zero de vegetação ($\pm 10^{\circ}\text{C}$), acima do qual a videira pode vegetar praticamente o ano todo e, dessa forma, seu ciclo é definido em função da data de poda (Regina et al., 2006).

As uvas colhidas em Janeiro (ciclo normal) estão sujeitas a elevadas temperaturas e precipitação durante o período de maturação e colheita, o que aumenta a incidência de podridões e resulta em colheita antes da completa maturação dos bagos.

Existe uma rápida degradação da acidez dos bagos cultivadas em ciclo de verão, principalmente nas primeiras semanas de amadurecimento, em função das temperaturas mais elevadas do período, pelo contrário o período de maturação é maior durante o ciclo de inverno, e as uvas apresentam teor de sólidos solúveis significativamente superiores às produzidas em ciclo de verão (Regina et al., 2006).

Os maiores teores de sólidos solúveis observados nas uvas colhidas na época de Inverno devem-se à redução da velocidade de maturação, provavelmente devido à baixa temperatura nocturna e menor precipitação, o que permite a permanência dos cachos na planta por um período maior, contribuindo para melhorar a composição dos bagos (Rosier, 2006). A colheita no Inverno aumenta significativamente o teor de sólidos solúveis (°Brix) e açúcares redutores (glicose e frutose) no mosto e sacarose não foi detectada (Regina et al., 2006). Favero (2007) atribuiu o aumento na concentração de sólidos solúveis em ciclo de Inverno (20,6 °Brix contra 17,4 °Brix no verão) à redução do diâmetro dos bagos e menor ocorrência de chuvas.

No estudo feito por Romero et al (2006), o teor de antocianinas também aumentou consideravelmente nas bagas colhidas no Inverno (comparando com vindima de Verão, que implica temperaturas mais altas e maiores chuvas), o que, juntamente com o teor de compostos fenólicos indica avanço da maturação, independentemente do tamanho dos bagos.

2 - OBJECTIVOS

O vale de São Francisco é uma região que começou recentemente a dedicar à produção de vinho, no entanto é o segundo maior produtor do Brasil. A região é situada na fronteira entre os estados da Bahia e Pernambuco, no noroeste do país com latitude entre 8-9S e cerca de 40W de longitude. É considerado por um clima semi-árido, com grande exposição solar durante o ano inteiro. As características de clima (semi-árido) e solo do Vale de São Francisco são bem diferentes das características da região sul do Brasil considerada a tradicional zona de produção de vinhos, que tem um clima mais temperado (Lucena, 2010).

Este trabalho pretendeu estudar a evolução das várias características da uva, partindo de amostras provenientes de vinhas na região do rio São Francisco, Brasil que se encontram em diferentes estados de maturação. Foram retiradas amostras de quatro talhões diferentes (802, 803, 804, 805) que foram podados em diferentes datas, os talhões 802, 803 e 805 continham, respectivamente, Cabernet Sauvignon, Aragonez e Alicante Bouschet enquanto o lote 804 continha as três castas referidas (sendo este um talhão experimental).

Antes de analisar as amostras foram avaliados dois tipos de análise diferentes referentes a precursores de aromas, taninos, antocianas e índices de fenóis totais, de forma a apurar qual a análise conseguiria conjugar melhor a prática e resultados fidedignos. Para além das características já referidas foram analisadas: açúcares, ácido málico, ácido tartárico e acidez total, para complementar o estudo de cada amostra.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

Localização:

As amostras retiradas para avaliação são provenientes do Grupo Vinibrasil, Vitivinícola Santa Maria, localizada na região Submédica do Vale do rio São Francisco, município de Lagoa Grande, Pernambuco, Brasil, em latitude 9° 02' S e longitude 40° 11' W.

Clima:

Utilizando a interpretação de Tonietto (1999) nesta região encontram-se 3 classes de clima vitícola diferentes ao longo do ano, sendo: IS-1 IH+3 IF-2 (Clima vitícola de seca moderada, muito quente, de noites quentes) época na qual foram recolhidas as amostras, IS+1 IH+3 IF-2 (Clima vitícola de seca forte, muito quente, de noites quentes) e, IS+2 IH+3 IF-2 (Clima vitícola sub-húmido, muito quente, de noites quentes).

Segundo Köppen, o clima predominante é do tipo 'BSwh', classificando-se como uma região semi-árida que apresenta a temperatura média anual de 26,4°C, com média das mínimas de 20,6°C, e média das máximas de 31,7°C.

Solo:

Pódzois

Uva:

Castas: Cabernet Sauvignon (lote 802 e 804), Alicante Bouschet (lote 804 e 805) e Aragonez (lote 803 e 804).

Foram retiradas amostras de cada um dos talhões referidos, sendo que cada um destes talhões se encontrava em estados de maturação diferente como se pode observar através das datas de poda, pintor e as datas previstas de vindima (indicadas no quadro seguinte).

Quadro 1 – Datas de Poda, Pintor e previsão de vindima de cada talhão analisado

Casta	Lote	Poda	Pintor	Vindima
Cabernet Sauv.	802	03-Fev.	13-Maio	07-Jun.
	804	12-Jan.	22-Abr.	10-Maio
Alicante Bousc.	804	12-Jan.	22-Abr.	10-Maio
	805	18-Jan.	28-Abr.	17-Maio
Aragonez	803	27-Jan.	10-Maio	24-Maio
	804	12-Jan.	22-Abr.	10-Maio

Os talhões referidos também apresentam algumas diferenças a nível vitícola como se pode observar no quadro seguinte.

Quadro 2 - Resumo de características vitícolas de cada talhão analisado

	Cabernet Sauvignon		Aragonez		Alicante Bouschet	
	Lote 802	Lote 804	Lote 803	Lote 804	Lote 805	Lote 804
Ano de plantação	2006	2006	2007	2006	2007	2006
Compasso	3X1	3X1	3X1	3X1	3X1	3X1
Sistema de Condução	monoplano retombante	monoplano ascendente	monoplano ascendente	monoplano ascendente	monoplano retombante	monoplano ascendente
Clones	15, 169, 191, 219, 337, 341 e 685	15, 169, 191, 337 e 685	massal	110-JBP, 54-EAN, 57-EAN, 60-EAN Embrapa	803, 804 e 805	803, 804 e 805
Porta Enxertos	140-Ru	IAC-313, IAC-572, 1103-P, SO4, 420-A e 101-14	IAC-572	IAC-313, IAC-572, 1103-P, SO4, 420-A e 101-14	IAC-572 e 1103-P	IAC-313, IAC-572, 1103-P, SO4, 420-A e 101-14

Para obter as amostras de cada talhão foi utilizado um plano de recolha (Anexo 1), que previa um total 27 amostras ao longo de 8 datas de recolha, no entanto factores meteorológicos impediram que o plano fosse seguido na sua totalidade e foram apenas recolhidas 12 amostras ao longo de 2 datas de recolha:

Dia 03-05-2010, foram recolhidas 6 amostras (1 amostra de cada talhão)

Dia 15-05-2010, foram recolhidas 6 amostras (1 amostra de cada talhão)

3.2 - Métodos

3.2.1 – Métodos de Extracção

Método de extracção proposto por Carbonneau e Champagnol (1993):

Foram pesados 100 bagos (P).

De seguida todos os bagos foram cortados ao meio e colocados num pano de 20X20 cm segurando todas as pontas espremer o conteúdo para uma proveta e assim medir o volume de todo o sumo proveniente dos bagos: v_1 (ml).

Retiraram-se todas as películas presas no pano e foram colocadas num recipiente com álcool 1/8 do peso dos bagos, ou seja v_2 (ml de álcool) = $1/8 \times v_1$, e de seguida adicionou-se uma solução tampão de volume igual ao medido na proveta menos o volume de álcool, pode ser representado por v_3 (ml de solução tampão) = $v_1 - v_2$.

O recipiente foi colocado na estufa com temperaturas de 30°C durante 24 horas.

Por último a amostra presente no recipiente foi centrifugada, obtendo desta forma uma solução que se considerou representativa

Método de extracção proposto por Brouzeix et al (1986):

Primeiro foram pesados 100 bagos da amostra (este valor corresponde a P).

Todos os bagos foram cortados ao meio e de seguida colocados num pano de 20X20 cm utilizando o pano como filtro, foi espremido o conteúdo e recolhido o sumo para uma proveta (de forma a medir o volume correspondente a v_1).

Foram retiradas todas as películas e grainhas retidas no pano e colocadas num recipiente com 20 ml de metanol durante 12 horas a -24°C.

Passadas as 12h foi retirado o líquido presente no recipiente e guardado (a temperatura ambiente), no recipiente onde se encontram as películas e grainhas foi colocado 16 ml de metanol e 4ml de H₂O durante 4 horas a temperatura ambiente.

Após 4h foi novamente retirado o líquido, o qual se juntou ao extracto anterior. No recipiente com as grainhas e películas juntou-se 10ml de metanol e 10ml e 10ml H₂O durante 4 horas a temperatura ambiente.

Após 4h foi retirado o extracto presente no recipiente, que se juntou aos extractos anteriores. No recipiente com as grainhas e películas colocou-se 20 ml H₂O durante 15 horas a -24°C.

Após 15h foi retirado o extracto presente no recipiente, juntando se aos extractos anteriores, enquanto no recipiente com as grainhas e películas foi colocado 15ml acetona e 5ml de H₂O durante 1hora.

Após 1h foi retirado o extracto presente no recipiente que se juntou aos restantes extractos, conseguindo assim um único extracto final que de seguida pode ser utilizado para leitura de fracção procianídica.

3.2.2 - Método de preparação de amostra para leitura de FT e antocianas

Método de análise para HPLC descrito por Roggero et al (1986):

Retirou-se as películas de 30 uvas. Após pesagem das películas, foram colocadas num recipiente com 40mL Metanol e 1mL de HCl.

De seguida a solução foi picada durante 4min, até ficar uma solução homogénea.

Por fim a solução foi centrifugada e retirado o líquido que mais tarde foi utilizado para leitura de fenóis totais e antocianas totais.

3.2.3 - Método de análise de precursores de aromas

Método de análise de precursores de aromas através da determinação de glicose-glucose, a partir da amostra de uvas, como foi descrito por Williams et al (1995):

Foram pesados 50 bagos. Após moer os bagos até obter uma solução homogeneizado, foram retirados 4g para tubos de centrifugadora.

A cada tubo foi adicionado 20ml de etanol a 50%, que de seguida foram agitados regularmente durante 1 hora.

Após 1h os tubos foram centrifugados a 350rpm durante 10 min.

Após centrifugação foram pipetados 4ml do sobrenadante para um balão volumétrico de 50 ml e medido o restante numa proveta. Foi adicionado ≈ 36 ml de H_2O destilada e uma gota de 5M HCl de forma a obter um $pH=2,25$.

De seguida preparou-se o set-pack, passando primeiro 10mL de metanol e depois 10mL de água destilada. De forma a isolar o glicósidos, passou-se a amostra no set-pack (com um débito de 1-2 mL/min), seguido de 30mL de água destilada, seguido de mais 10 mL de água destilada e por fim mais 10 mL de água destilada.

Para eluição dos glicósidos pipetou-se 1,5 mL de etanol e de seguida 3mL de água destilada, recuperado num balão volumétrico de 5mL e ajustou-se o volume com água destilada.

A partir da solução presente no balão volumétrico preparou-se uma solução controlo, pipetou-se 1mL do eluído + 2 mL de água destilada para tubo 1 a temperatura ambiente, no tubo 2 foi colocado 1ml de eluído+ 2mL de H_2SO_4 após mexer cuidadosamente fazer a hidrólise para libertar a glucose colocando em banho de $100^{\circ}C$ durante 1h.

No tubo 1 (controlo) foi apenas necessário pipetar para um balão volumétrico de 5mL e ajustar o volume, no tubo 2 (amostra) foi necessário adicionar 1,2mL 4,4M NaOH e ajustar a pH 8 cm 0,1M NaOH ou 1N H_2SO_4 de seguida ajustou-se o volume a 5mL em balões volumétricos.

Foi retirado 1mL do tubo 1 (controlo) e 1mL de tubo 2 (amostra) para tubos diferentes e adicionado em cada tubo: 10mL de metanol + 10mL de água destilada.

Pipetou-se 1mL do tubo 1 (controlo) para a cuvete e adicionou-se 1mL de água destilada + 1mL de solução kit 1 no fim agitar cuidadosamente, pipetou-se 1mL do tubo 2 (amostra) para cuvete e adicionou-se 1mL de água destilada + 1mL de solução kit 1 no fim agitou-se cuidadosamente.

Após 5 minutos ambas as cuvetes foram lidas no espectrofotómetro a 340nm, de seguida adicionou-se 20 μ L da solução kit 2 e agitou-se para voltar a ler no espectrofotómetro após 20 minutos.

Método de análise de precursores de aromas através da determinação de glicose-glucose, a partir da amostra de solução líquida proveniente das uvas, como foi descrito por Williams et al (1995):

Usualmente utiliza-se vinho, neste caso utilizou-se a solução proveniente do método Carbonneau e Champagnol. Ajustou-se a pH=2,25 um extracto da amostra previamente sujeita ao método Carbonneau.

De seguida preparou-se o set-pack, passando primeiro 10mL de metanol e depois 10mL de água destilada. De forma a isolar o glicósidos, passou-se a amostra no set-pack (com um débito de 1-2 mL/min), seguido de 30mL de água destilada, seguido de mais 10 mL de água destilada e por fim mais 10 mL de água destilada.

Para eluição dos glicósidos pipetou-se 1,5 mL de etanol e de seguida 3mL de água destilada, recuperado num balão volumétrico de 5mL e ajustou-se o volume com água destilada.

A partir da solução presente no balão volumétrico preparou-se uma solução controlo, pipetou-se 1mL do eluído + 2 mL de água destilada para tubo 1 a temperatura ambiente, no tubo 2 foi colocado 1mL de eluído+ 2mL de H₂SO₄ após mexer cuidadosamente fazer a hidrólise para libertar a glucose colocando em banho de 100°C durante 1h.

No tubo 1 (controlo) foi apenas necessário pipetar para um balão volumétrico de 5mL e ajustar o volume, no tubo 2 (amostra) foi necessário adicionar 1,2mL 4,4M NaOH e ajustar a pH 8 cm 0,1M NaOH ou 1N H₂SO₄ de seguida ajustou-se o volume a 5mL em balões volumétricos.

Foi retirado 1mL do tubo 1 (controlo) e 1mL de tubo 2 (amostra) para tubos diferentes e adicionado em cada tubo: 10mL de metanol + 10mL de água destilada.

Pipetou-se 1mL do tubo 1 (controlo) para a cuvete e adicionou-se 1mL de água destilada + 1mL de solução kit 1 no fim agitar cuidadosamente, pipetou-se 1mL do tubo 2 (amostra) para cuvete e adicionou-se 1mL de água destilada + 1mL de solução kit 1 no fim agitou-se cuidadosamente.

Após 5 minutos ambas as cuvets foram lidas no espectrofotómetro a 340nm, de seguida adicionou-se 20µL da solução kit 2 e agitou-se para voltar a ler no espectrofotómetro após 20 minutos. Leituras no Anexo 4.

3.2.4 - Percentagem de álcool provável

O método utilizado foi por refractometria, tendo sido utilizado um refractómetro de mão (método OIV, 1990). Utilizou-se o sumo retirado directamente dos bagos no método Carbonneau.

3.2.5 - pH

Para determinação de pH utilizou-se um método potenciométrico (OIV, 1990), baseado na determinação da diferença de potencial entre dois eléctrodos imersos no meio em análise (sumo retirado directamente dos bagos no método Carbonneau) – um (eléctrodo de referencia) com um potencial constante e conhecido, outro (eléctrodo de medida) com um potencial determinado pelo pH do meio.

3.2.6- Acidez Total

Para obter resultados relativos a acidez total das amostras foi efectuada uma titulação acidimétrica (NPI – 2139, 1987), que se baseia na neutralização dos ácidos através de uma solução alcalina (NaOH 0.1M) na presença de um indicador azul de bromotimol. Utilizou-se o sumo retirado directamente dos bagos no método Carbonneau.

3.2.7 - Acido Málico

Recorreu-se ao método colorimétrico de Rebelein (Curvelo-Garcia, 1988).

Previamente foi utilizada uma coluna de resina de iões, de forma a isolar o ácido málico a partir do sumo dos bagos obtido no método Carbonneau. De seguida o ácido málico é doseado colorimetricamente no eluído, através de uma reacção com o ácido sulfúrico concentrado (96%) e com o ácido cromotrópico adquirindo uma coloração amarela, e a intensidade da cor é quantificada por espectrofotometria numa leitura a 420nm.

3.2.8 - Acido Tartárico

Na determinação do ácido tartárico utiliza-se o mesmo método que para o ácido málico até à recolha do eluído, método colorimétrico de Rebelein (Curvelo-Garcia, 1988).

Depois de isolar este eluído (ácido málico) fez-se reagir este ácido com o ácido vanádico a um determinado pH, e assim formando uma solução alaranjada que foi de seguida quantificada numa leitura no espectrofotómetro a 490 nm, durante 1 minuto e 30 segundos.

3.2.9 - Compostos fenolicos totais

Recorreu-se ao método Folin-Ciocaltau, método reduzido do O.I.V. (Curvelo-Garcia, 1988), utilizando a solução obtida através do método Carboneau.

Em meio alcalino, os fenóis reduziram a mistura dos ácidos fosfotungstico e fosfomolibdico em óxidos de tungsténio e de molibdénio, de cor azul. A coloração obtida apresenta um máximo a 750nm, sendo a sua intensidade proporcional à concentração de polifenóis. Não sendo possível operar a 750nm, foi usado o comprimento de onda de 700nm.

3.2.10 - Antocianas totais

Recorreu-se ao método de Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965), utilizando a solução obtida através do método Carboneau.

A determinação do teor de antocianinas fundamenta-se na diferença entre a absorvância a 520 nm de um tubo descolorado pela acção do bissulfito de sódio, por forma a acidificar o meio para deslocar o catião flavílio (sem acidificação haveria outras formas de antocianas que não absorveriam a 520nm), e de um tubo não descolorado.

Através de espectrofotometria resultaram assim duas leituras a 520nm para cada amostra, uma anterior e outra após adição de bissulfito de sódio, e de seguida pode-se determinar o teor total de antocianinas através da diferença entre estas duas absorvâncias, através de uma curva padrão (valores presentes no Anexo 3).

3.2.11 - Taninos

Após a obtenção de um extracto da amostra proveniente do método de Carbonneau, procedeu-se ao isolamento dos flavanois e respectivos benziltio-eteres numa coluna de fractogel (coluna de vidro da Quickfit CR 12/10 de 100X10, cheia com Fractogel TSK HW-40F).

Primeiro fez-se passar através da coluna, 30ml de uma mistura de etanol/água/TFA com concentrações respectivas de 55%, 45% e 0.05% (V/V/V) permite o acondicionamento da coluna antes de introduzir a amostra, permitindo a eluição dos fenóis simples e flavonóides monóméricos.

De seguida fez-se passar 4ml proveniente da amostra, previamente tratada pelo método de Carbonneau, a um débito regular de aproximadamente 0,7 ml/min mantido por uma bomba de vácuo.

Após a passagem de amostra, recorreu-se de novo a 30ml da mistura etanol/água/TFA, de forma a retirar a fracção monomérica.

Por fim utilizou-se 30ml de uma solução de acetona/água com concentrações respectivas de 60%:40% (V:V) que após passar na coluna recolhe os flavanoides poliméricos que se encontram fixos no gel.

Esta fracção é evaporada até a secura, diluída em 1 ml de metanol e colocada em vielos num congelador de forma a poderem ser tiolizados e analisados por HPLC mais tarde.

De forma a proceder a tiolização, retirou-se 100µl de amostra e 100µl de tolueno- α -thiol e colocaram-se ambas as soluções num vielo que de seguida se colocou num banho de água a 55°C durante 7 minutos.

A amostra já tiolizada é arrefecida durante 1 minuto num copo de vidro com água á temperatura ambiente, e analisada imediatamente no HPLC, com uma injeccção de 10µl que é sujeita a uma corrida de 20minutos (segundo o método proposto por M. Ferreira, 2006).

Após a corrida é obtido um gráfico (exemplo presente no Anexo 5) no qual se pode fazer as leituras dos várias áreas correspondentes aos valores de catequina, epicatequina, epicatequina-3-galato, epigallocatequina, catequina A, catequina B, epicatequina benziltioeter, epicatequina 3-galato beziltioeter (valores em Anexo 6).

4 - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

De forma a poder analisar as amostras provenientes do Brasil da forma mais rigorosa mas também mais eficiente, foram efectuados testes a duas amostras, com o objectivo de avaliar alguns dos métodos anteriormente explicados e assim eleger aqueles que seriam utilizados no estudo. Para realizar o teste utilizaram-se duas amostras, uma da casta Touriga Nacional, recolhida no Instituto Superior de Agronomia e congelada até ser utilizada. A outra amostra é da casta Syrah e foi recolhida na região Submédica do Vale do rio São Francisco, município de Lagoa Grande, Pernambuco Brasil, e foram seguidas para as duas amostras de igual forma as orientações dadas (em anexo).

Para analisar a concentração de antocianinas foram testados dois métodos distintos anteriormente descritos: método Carboneau e método Roggero.

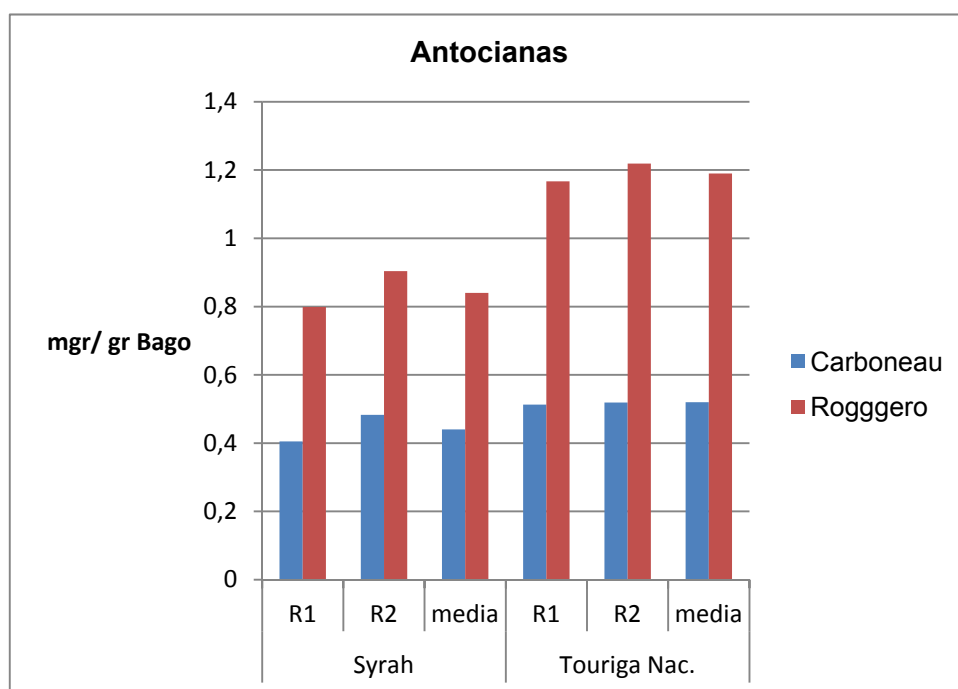


Imagem 1 - Teor de antocianinas (mgr/gr bago) extraídos com o método Carboneau e com o método Roggero nas castas Syrah e Touriga Nacional

Ambos os métodos revelaram diferenças entre as castas apresentadas demonstrando tendências para valores diferentes, os valores entre diferentes repetições da mesma amostra também não demonstraram casos de anormalidade. Desta forma a decisão sobre qual o método a utilizar foi tomada tendo em conta a facilidade e o tempo despendido, sendo o Carboneau o método escolhido.

Para analisar a concentração de precursores de aromas, foram testados dois métodos distintos anteriormente descritos: método GG Clássico (completo) e método Carbonneau completado com o método G-G (utilizando a solução resultante do primeiro método como vinho / mosto no método G-G).

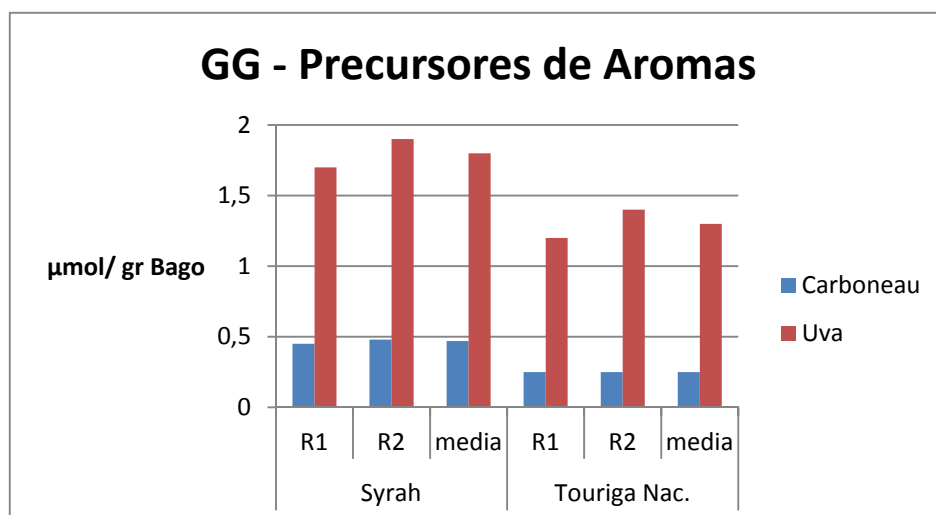


Imagem 2 – Teor de precursores de aromas (μmol/gr bago) extraídos através do método tradicional (uva) e do método Carbonneau nas castas Syrah e Touriga Nacional

Para avaliação de estes dois métodos, existe sempre uma parte comum no final do processo, sendo que principal diferença se situa no tratamento feito as uvas a avaliar. Embora o tratamento feito com uvas demonstre um maior volume de precursores de aromas por grama de bago, a variação entre repetições é menor no método Carbonneau esse facto juntamente com a facilidade de tratamento em laboratório tornou este método o eleito para avaliação de precursores de aromas.

Para analisar a fracção procianídica, foram testados dois métodos distintos anteriormente descritos: método Brouzeix completado com tiolise e método Carbonneau completado também com tiolise.

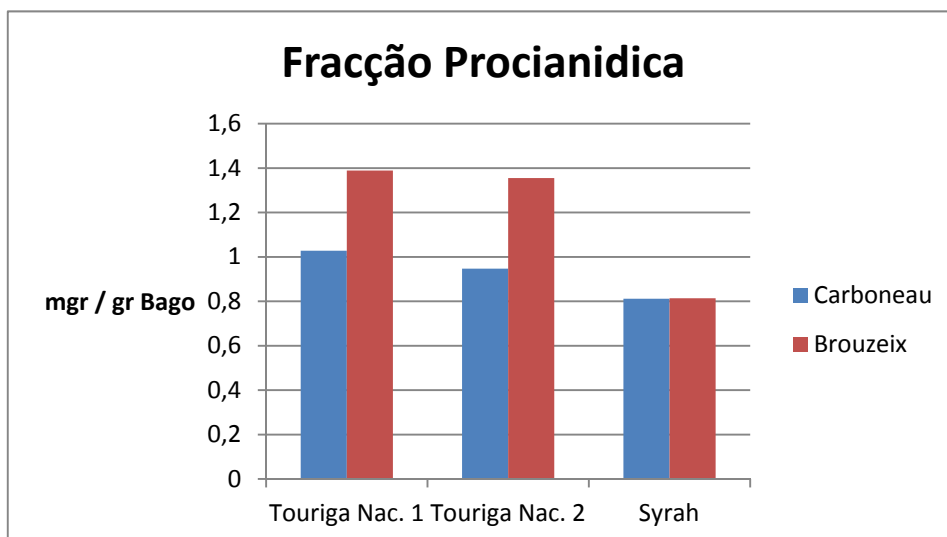


Imagem 3 – Teor da fracção procianídica (mgr/gr bago) extraído com o método Carboneau e o método Brouzeix em duas amostras da casta Touriga Nacional e uma amostra da casta Syrah

Também para avaliação da fracção procianídica foi escolhido o método Carboneau tendo em conta que os resultados encontrados são não só perceptíveis para comparação entre evolução de castas ao longo da maturação como correspondentes aos valores que poderíamos encontrar em mostos sujeitos a tratamentos de fermentação numa adega.

5 - RESULTADOS e DISCUSSÃO

Foram retiradas amostras de quatro talhões diferentes (802, 803, 804, 805) que foram podados em diferentes datas, os talhões 802, 803 e 805 continham, respectivamente, Cabernet Sauvignon, Aragonez e Alicante Bouschet enquanto o talhão 804 continha as três castas referidas. Pretendeu-se assim analisar a evolução de cada casta em função da data de poda e duas possíveis datas de vindima.

Os valores obtidos para a acidez total e pH estão correlacionados e de acordo com a bibliografia, a acidez total ao longo da maturação vai diminuindo enquanto o pH aumenta, sendo a sua concentração também bastante afectada por diversos factores. Ambas as características estão apresentadas no quadros seguintes e demonstram que os diversos factores têm influência na variação destas características e a conjugação de todos deram origem aos resultados que nem sempre seguem o esperado.

No caso da casta Cabernet Sauvignon o pH evolui de forma positiva ao longo do período indicado, tendo em conta o número de dias entre a poda e a recolha de amostras. Em relação a acidez total foi observada uma diminuição progressiva ao longo do período indicado, sendo que no talhão 802 a acidez apesar de ter uma diferença de 10 dias de maturação tem uma diferença muito pouco acentuada da ultima amostra do talhão 804, esta diminuição foi acompanhada pelo referido aumento constante de pH, tal como esperado.

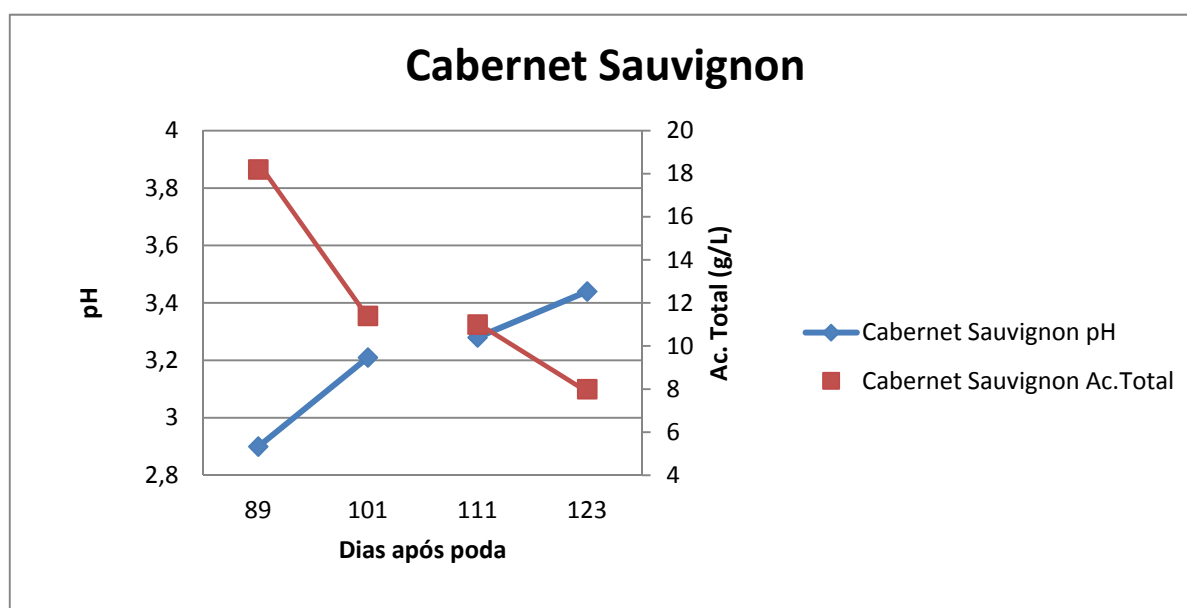


Imagem 4 - Evolução de pH e Ac. Total (g/L) na casta Cabernet Sauvignon, amostra com 89 e 101 dias após poda pertencem ao talhão 804, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 802

Relativamente a casta Aragonez e a casta Alicante Bouschet os resultados sofreram algumas variações não esperadas, a acidez variou de acordo com o pH mas se observarmos apenas o período decorrente entre poda e recolha de amostras os resultados não se apresentam completamente coerentes com a bibliografia, enquanto os resultados obtidos a partir do mesmo talhão e sujeitos a mesma evolução meteorológica durante o período analisado demonstram sempre a evolução esperada. Em relação à casta Aragonez os resultados evoluíram de forma positiva dentro do mesmo talhão, sendo que os valores pH obtidos na primeira recolha de amostras (feita a 03 de Maio de 2010) foram ambas inferiores aos valores obtidos na segunda recolha de amostras (feita a 15 de Maio de 2010) neste caso o período entre poda e recolha de amostras tem um efeito menor pois foram observados algum crescimento de acidez total e decrescimos de pH que não eram esperados. Os resultados obtidos a partir do mesmo talhão e sujeitos a mesma evolução meteorológica durante o período analisado são o principalmente factor a ter em conta para esperar uma evolução crescente no pH e decrescente em relação a acidez total, estas diferenças também podem ser explicadas pelos diferentes clones utilizados em cada talhão tendo em conta que o sistema de condução é os porta-enxertos são muito similares nos diferentes talhões de Aragonez.

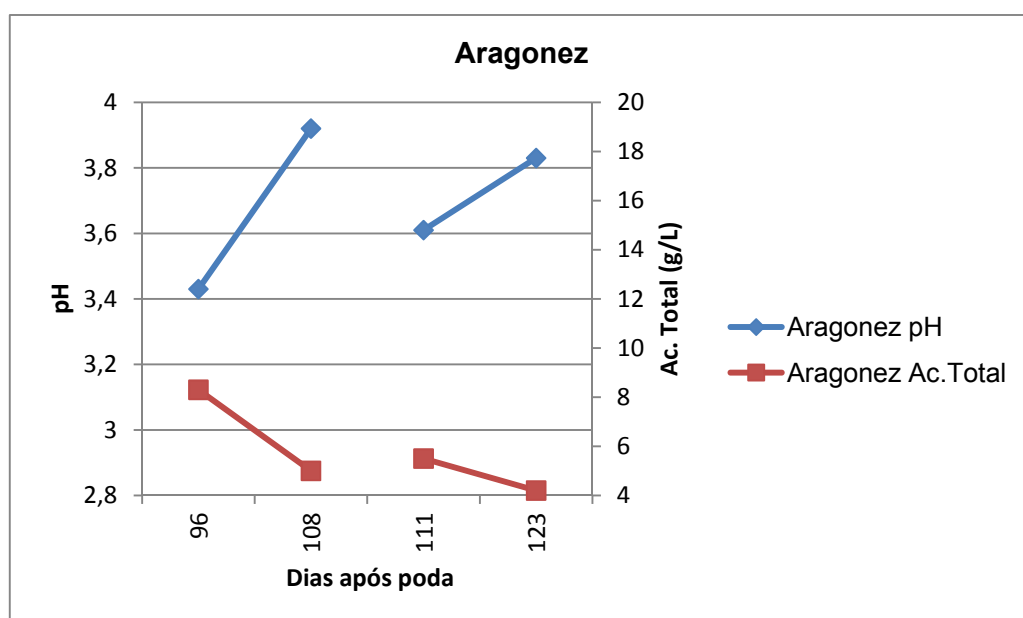


Imagem 5 – Evolução de pH e Ac. Total (g/L) na casta Aragonez, amostra com 96 e 108 dias após poda pertencem ao talhão 803, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

No caso de Alicante Bouschet teve leituras muito diferentes do esperado, tendo em conta que apesar do período decorrente entre poda e recolha de amostras ser menor os valores de pH apresentados são relativamente menores entre 1ª e 2ª amostra e entre 3ª e 4ª amostra e os resultados de acidez total que aumentam ligeiramente entre a 3ª e 4ª amostra (embora a diferença não seja muito relevante), quando comparadas as duas amostras recolhidas na primeira data e o resultado foi idêntico na segunda data de recolha de amostras, sendo que ambos os talhões evoluíram conforme era esperado da primeira para a segunda recolha de amostras, podendo este facto estar ligado às condições meteorológicas presentes durante o período decorrente entre as duas recolhas. Podemos também referir que os valores de pH do talhão 804 serem inferiores ao talhão 805 podem ser devidos a diferença de sistema de condução, no entanto seria de esperar o contrário pois o sistema presente no talhão 804 (monoplano ascendente) está mais sujeito a exposição solar e por essa razão deveria aumentar mais rapidamente o seu pH.

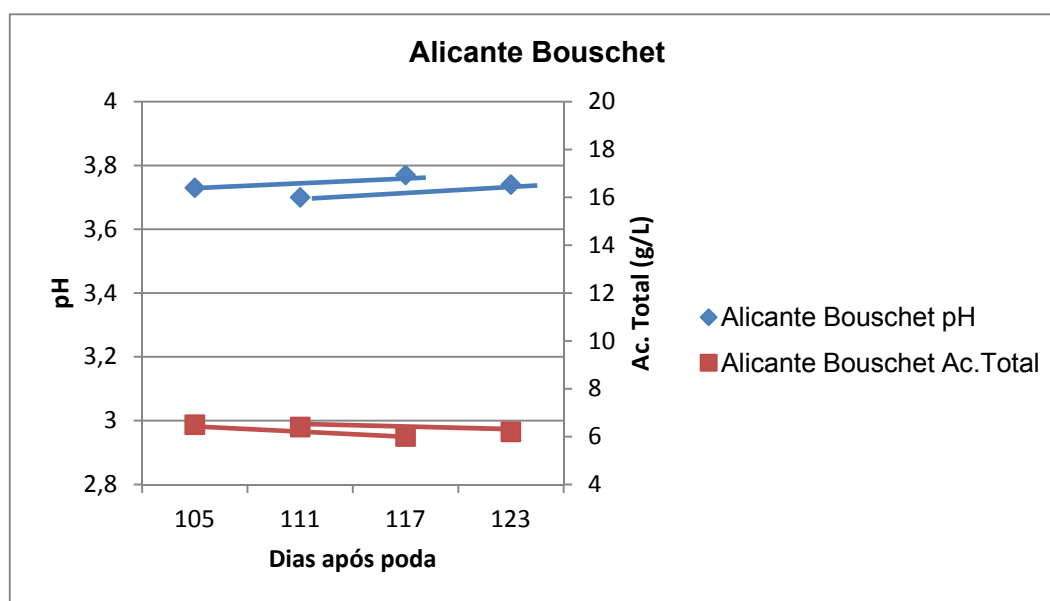


Imagem 6 - Evolução de pH e Ac. Total (g/L) na casta Alicante Bouschet, amostra com 105 e 117 dias após poda pertencem ao talhão 805, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

Relativamente aos valores de ácido málico ambas as castas Cabernet Sauvignon e Aragonez apresentam resultados que decrescem ao longo do período analisado, de acordo com o esperado. Sendo assim a casta Aragonez não apresenta totalmente concordantes com os valores de pH e de acidez total vistos anteriormente.

Os valores de ácido tartárico, para as castas Cabernet Sauvignon e Aragonez, variam dentro de cada talhão conforme se esperava, no entanto se tomarmos em conta todo período analisado em ambos os talhões os resultados contrariam a bibliografia, pois existe um aumento não esperado. No caso da casta Cabernet Sauvignon é possível justificar através das diferenças entre porta-enxertos presentes nos dois talhões e principalmente devido a diferença de sistemas de condução utilizados, sendo a exposição solar menor no caso do talhão 802 (monoplano retombante) e por isso ter valores mais elevados de ácido tartárico em relação ao talhão 804 (monoplano ascendente). No caso da casta Aragonez podemos justificar estas leituras com base nas diferenças de porta-enxertos. Em ambas as castas os valores apresentados na segunda recolha de amostra demonstram, que sujeito as mesmas condições climáticas, o talhão cuja poda foi feita mais tarde, tem uma menor perda de ácido tartárico comparando com talhão cuja poda foi feita mais cedo.

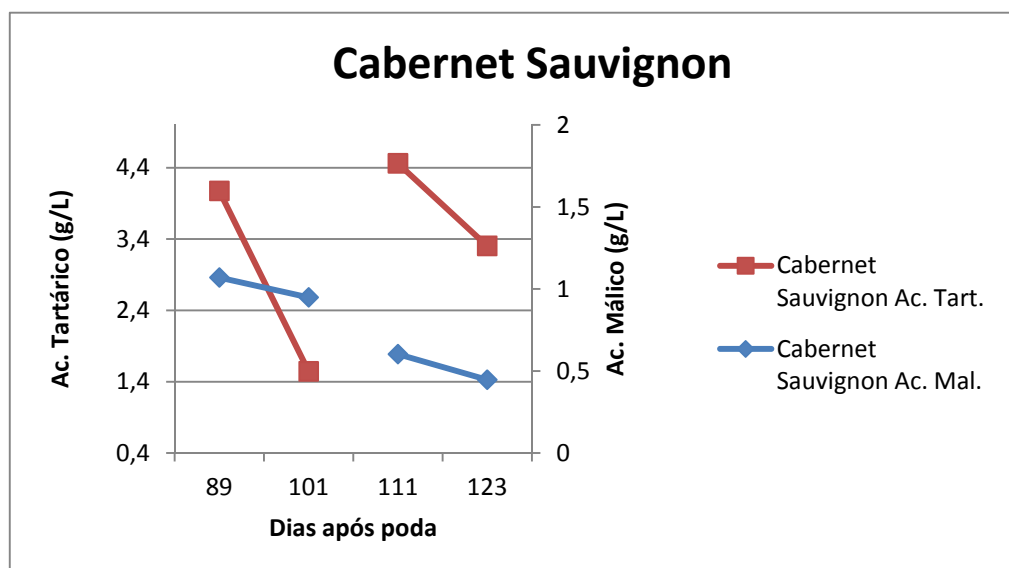


Imagem 7 - Evolução de Ac. Málico e Ac. Tartárico (g/L) na casta Cabernet Sauvignon, amostra com 89 e 101 dias após poda pertencem ao talhão 804, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 802

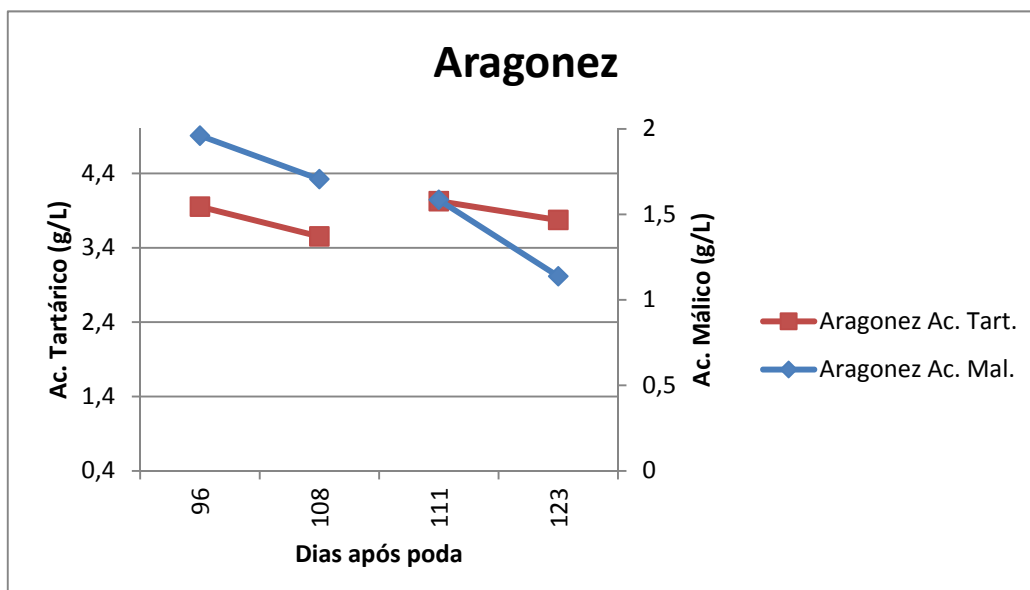


Imagem 8 - Evolução de Ac. Málico e Ac. Tartárico (g/L) na casta Aragonez, amostra com 96 e 108 dias após poda pertencem ao talhão 803, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

A casta Alicante Bouschet, em relação ao ácido málico, apresentou valores mais elevados no talhão 805 que pode ser explicado pelos factores porta-enxerto e principalmente sistema de condução (monoplano retombante) que protege mais a planta da exposição solar e por essa razão não houve tanta degradação comparando com o talhão 804. Relativamente ao aumento de ac. Málico entre primeira e segunda recolha deve-se ao facto destes talhões estarem já em sobre-maturação e por essa razão a proporção de ácido presente nos bagos. No caso do ácido tartárico os resultados não são o esperado em nenhum caso, sendo que dentro de cada talhão os valores crescem assim como ao longo dos dias após a poda. Neste ultimo caso a evolução pode ser devido ao facto desta casta se encontrar em fase de sobre-maturação e como foi explicado anteriormente a que as uvas fossem perdendo o seu conteúdo em água aumentando assim a concentração de ácidos por bago.

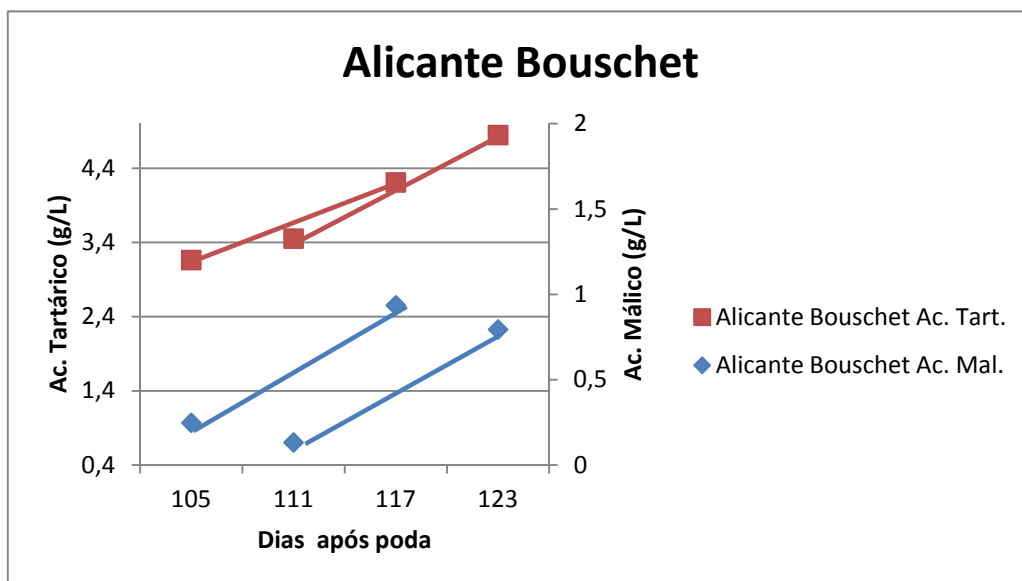


Imagem 9 - Evolução de Ac. Málico e Ac. Tartárico (g/L) na casta Alicante Bouschet, amostra com 105 e 117 dias após poda pertencem ao talhão 805, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

Os valores analisados referentes aos açúcares presentes, mais uma vez, as castas Cabernet Sauvignon e Aragonez os resultados obtidos não aumentam ao longo do número de dias após poda mas apresentam valores aumentam dentro de cada talhão quando comparadas a primeira e a segunda colheita, estes resultados podem ser devidos a diferenças referentes a porta-enxertos e sistemas de condução no caso da casta Cabernet Sauvignon ou diferenças de clones no caso da casta Aragonez mas também devido às condições de armazenamento de açúcares nas uvas que a partir de certo limite pode estabilizar ou mesmo decrescer se as condições meteorológicas forem desfavoráveis (como temperaturas muito elevadas). A casta Alicante Bouschet apresenta valores de açúcares que aumentam ao do período analisado de acordo com o esperado, no entanto devemos ter em conta os valores analisados anteriormente (acidez total, ácido málico e ácido tartárico) que confirmam que as videiras da casta Alicante Bouschet já se encontravam em estado de sobre-maturação, desta forma a o aumento de açúcares pode ser devido a desidratação e diminuição dos bagos.

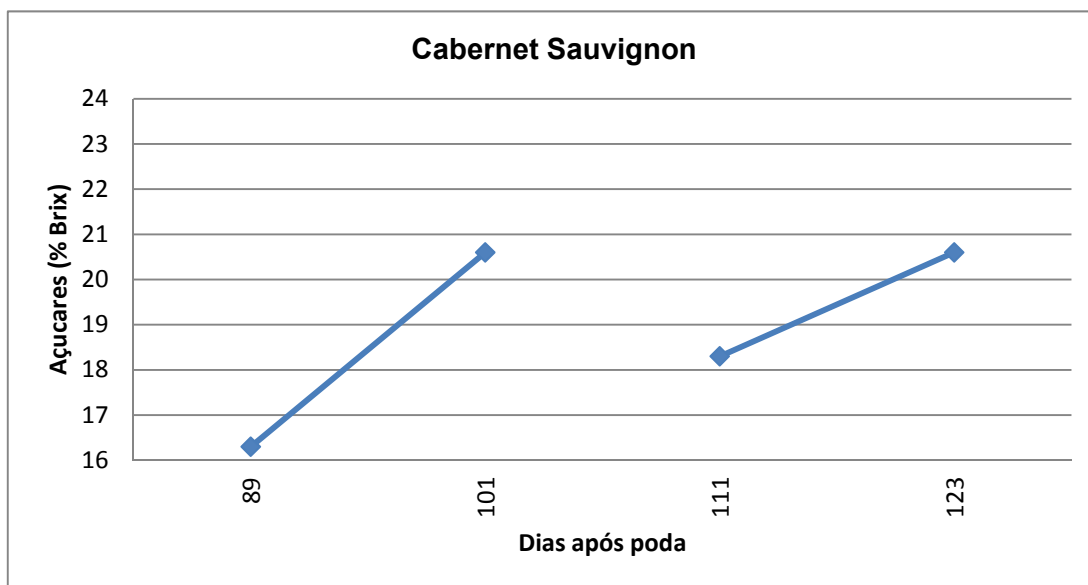


Imagem 10 - Evolução de açúcares (% Brix) na casta Cabernet Sauvignon, amostra com 89 e 101 dias após poda pertencem ao talhão 804, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 802

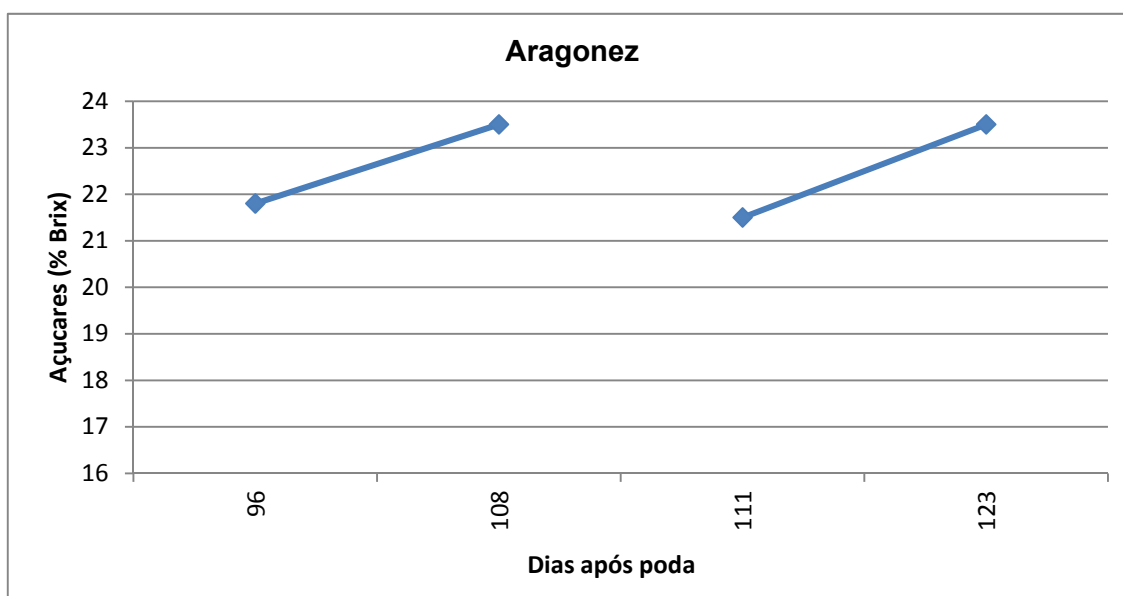


Imagem 11 - Evolução de açúcares (% Brix) na casta Aragonez, amostra com 96 e 108 dias após poda pertencem ao talhão 803, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

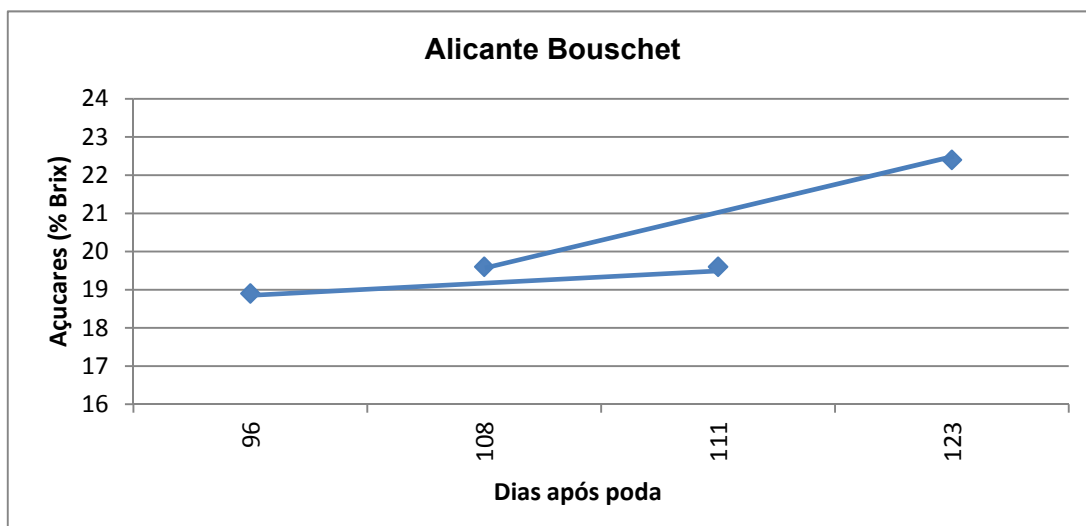


Imagem 12 - Evolução de açúcares (% Brix) na casta Alicante Bouschet, amostra com 105 e 117 dias de maturação pertencem ao talhão 805, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

Foram também avaliados os índices de fenóis totais e antocianas de todas as amostras. Para os valores de IFT na casta Cabernet Sauvignon foi observado um decréscimo constante ao longo do período analisado, enquanto na casta Aragonez foi também observado um decréscimo ao longo do período analisado embora a diferença entre os valores tenha sido bastante menor, estes decrescimos são explicados pelas elevadas temperaturas. No caso de Alicante Bouschet os valores não demonstram nenhuma tendência entre poda e recolha das amostras se forem vistos de forma geral mas ambos os talhões apresentam um crescimento de IFT entre a primeira e a segunda recolha, este facto pode ser mais uma vez explicado pelo facto desta casta se encontrarem em estado de sobre-maturação no momento da segunda recolha.

As antocianas na casta Cabernet Sauvignon e no talhão 804 da casta Aragonez apresenta valores muito próximos entre si podendo concluir-se que os valores não se alteram, no entanto no talhão 803 da casta Aragonez assim como no talhão 805 da casta Alicante Bouschet a quantidade de antocianas presentes decresce ao longo do período descrito, também explicado pelas elevadas temperaturas, sendo de notar que certos clones (que nos talhões da casta aragonez são diferentes) ou porta-enxertos sejam mais susceptíveis. No talhão 804 o Alicante Bouschet apresenta uma tendência contrária, observando-se um aumento de antocianas ao longo do mesmo período, que se deve ao facto desta casta se apresentar já em estado de sobre-maturação mais avançado comparando com o talhão 805, devido ao sistema de condução (monoplano ascendente) que sujeita a videira a uma maior exposição solar.

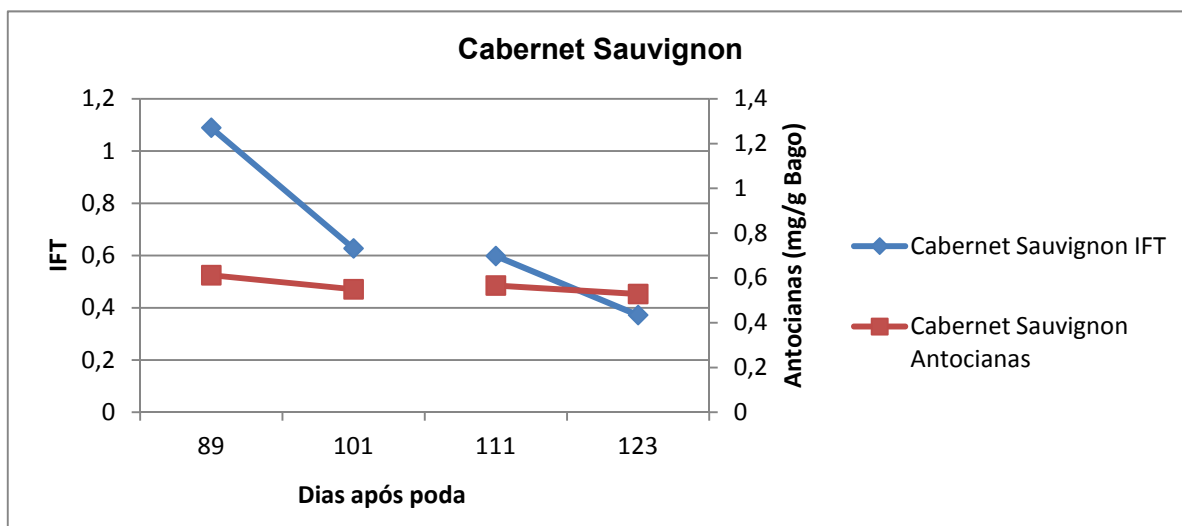


Imagem 13 - Evolução de Índice de fenois totais e Antocianas (mg/gr bago) na casta Cabernet Sauvignon, amostra com 89 e 101 dias após poda pertencem ao talhão 804, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 802

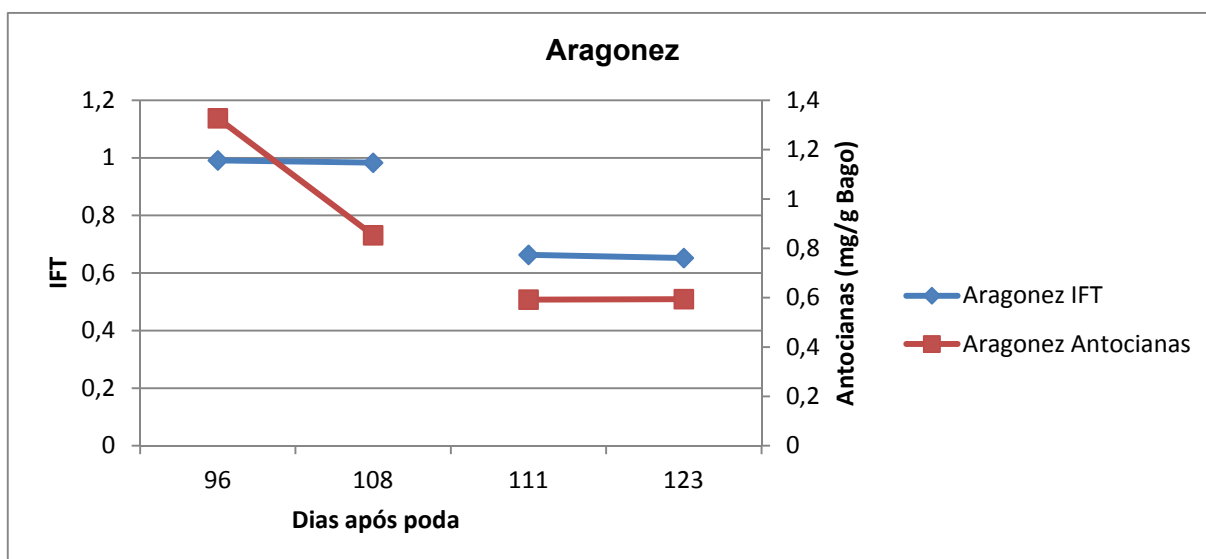


Imagem 14 - Evolução de Índice de fenois totais e Antocianas (mg/gr bago) na casta Aragonez, amostra com 96 e 108 dias após poda pertencem ao talhão 803, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

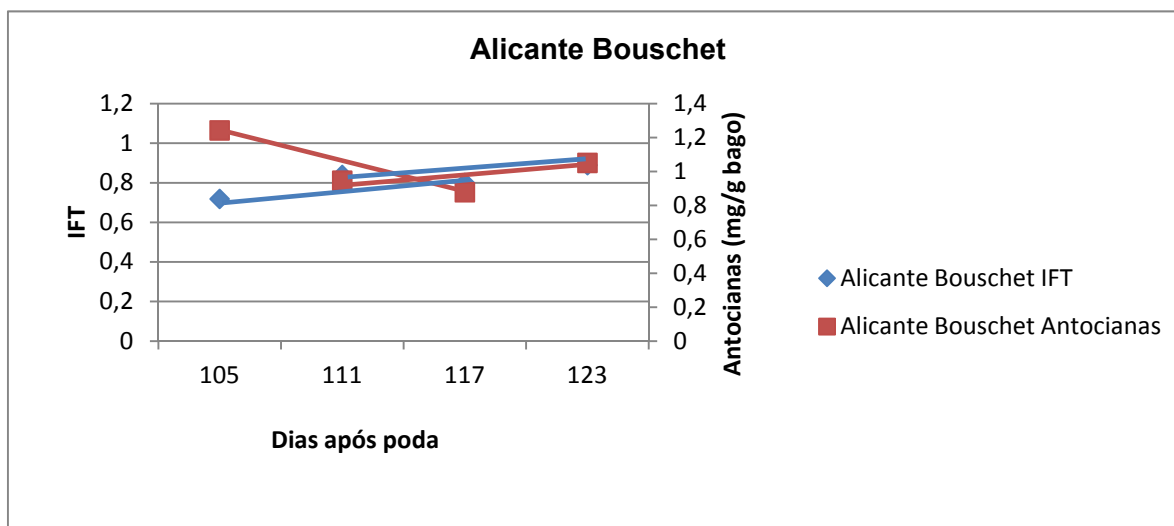


Imagem 15 – Evolução de Índice de fenóis totais e Antocianinas (mg/gr bago) na casta Alicante Bouschet, amostra com 105 e 117 dias após poda pertencem ao talhão 805, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

Nos quadros seguintes estão apresentados os valores relativos a precursores de aromas que apresenta diferentes comportamentos, na casta Cabernet Sauvignon os valores decrescem no talhão 802 e mantêm-se praticamente inalterados no talhão 804 (podendo ser explicado pelo sistema de condução e porta-enxertos diferentes), no entanto ao longo do processo entre as várias recolhas de amostras podemos observar também um decréscimo.

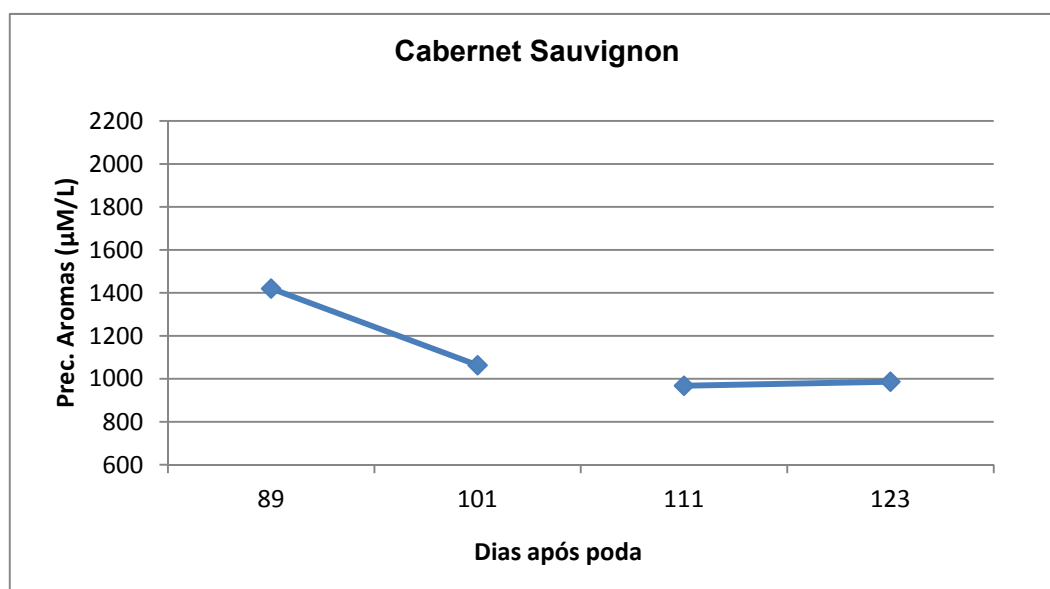


Imagem 16 - Evolução de precursores de aromas (µM/L) na casta Cabernet Sauvignon, amostra com 89 e 101 dias após poda pertencem ao talhão 804, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 802

No caso da casta Aragonez o talhão 803 apresenta também um decréscimo entre a primeira e a segunda recolha no entanto o talhão 804 apresenta um comportamento diferente. Relativamente à mesma casta os precursores apresentaram uma tendência para aumentar ao longo de todo o processo, no entanto a diferença entre talhões deve ser assinalada demonstrando que certos clones, possam ter mais tendência para produção de compostos terpénicos (que aumentam ao longo da maturação) e outros possam ter mais tendência para ácidos gordos (que normalmente apresentam um padrão decrescente ao longo da maturação).

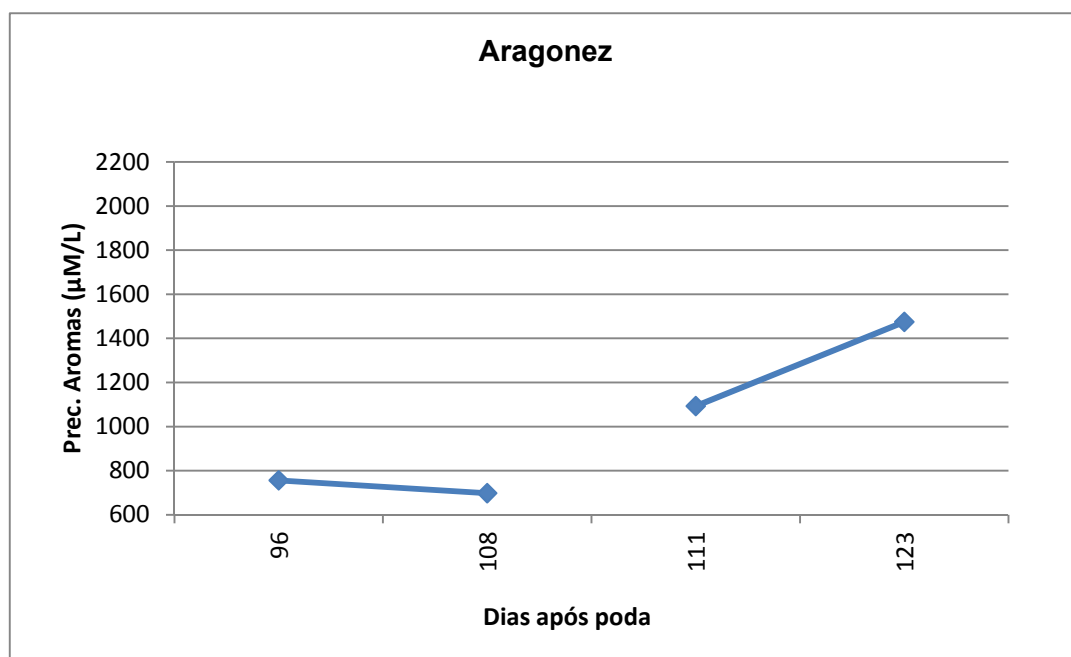


Imagem 17 - Evolução de precursores de aromas (µM/L) na casta Aragonez, amostra com 96 e 108 dias após poda pertencem ao talhão 803, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

Por ultimo a casta Alicante Bouschet tem comportamentos semelhantes no talhão 805 e 804, nos quais os valores de precursores decrescem ao longo do processo de recolha de amostras, observando os resultados de uma forma global a primeira de recolha de amostras os valores situam-se acima de 2000µmol/gr enquanto na segunda recolha de amostras os valores situam-se ambos entre 1600 e 1700µmol/gr no entanto existem variações ao longo da todo processo que não permite considerar a evolução constante e decrescente, o que pode ser explicado pela diferença entre sistemas de condução.

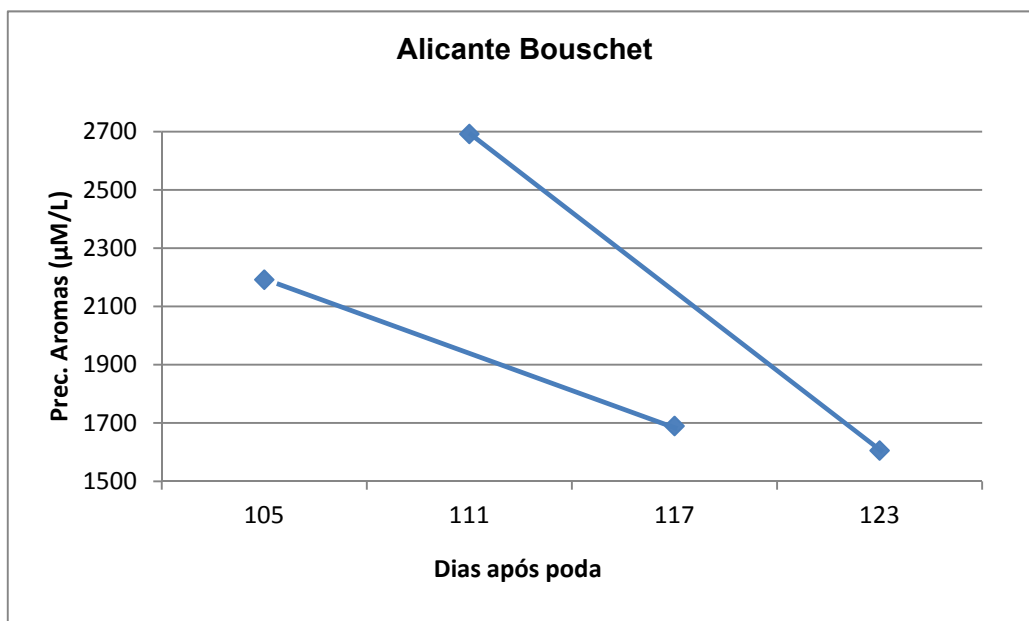


Gráfico 18 - Evolução de precursores de aromas (µM/L) na casta Alicante Bouschet, amostra com 105 e 117 dias após poda pertencem ao talhão 805, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

Nos quadros seguintes estão apresentados os resultados referentes aos taninos presentes na amostra. A evolução da fracção procianídica na casta Cabernet Sauvignon ao conforme o esperado apresenta uma diminuição do grau de polimerização em cada talhão, ou seja, na primeira data de recolha de amostras os valores são maiores comparando com a segunda data de recolha de amostras, o talhão 804 apresenta uma diminuição menor, explicada pela tendência para estabilização destes valores nas semanas anteriores a vindima, no entanto quando visto ao longo de toda a evolução entre os dois talhões não é constante.

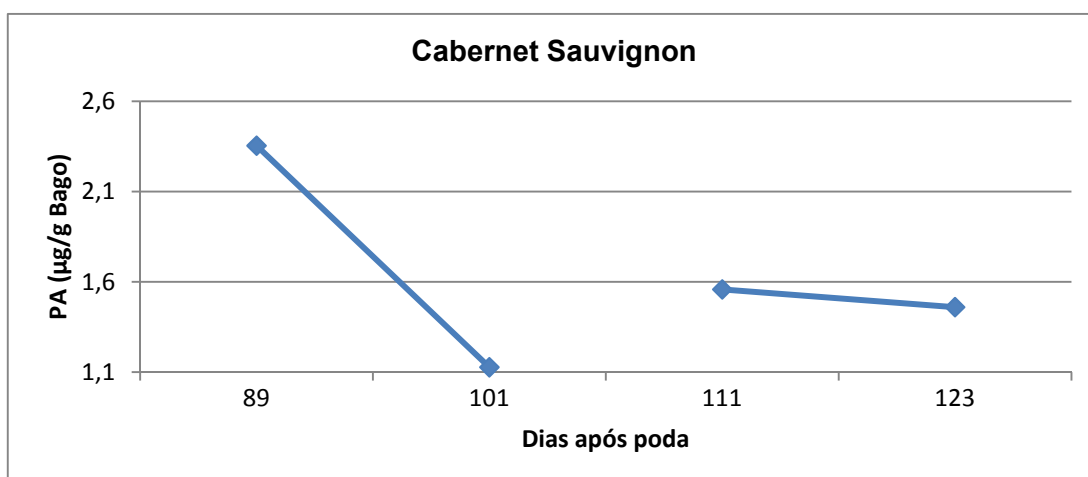


Imagem 19 - Evolução da fracção procianídica (µg/g bago) na casta Cabernet Sauvignon, amostra com 89 e 101 dias após poda pertencem ao talhão 804, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 802

Nas castas Aragonez e Alicante Bouschet encontramos uma evolução esperada, manteve o mesmo valores relativos a fracção procianidica nas primeiras três amostras, de acordo com Habertson et al (2004) é esperado uma estabilização nas quatro semanas anteriores a vindima, sendo que no ultima amostra o valor mais elevado pode ser explicado pelo facto da amostra se encontrar já em sobrematuração como já foi explicado anteriormente em relação a casta Alicante Bouschet.

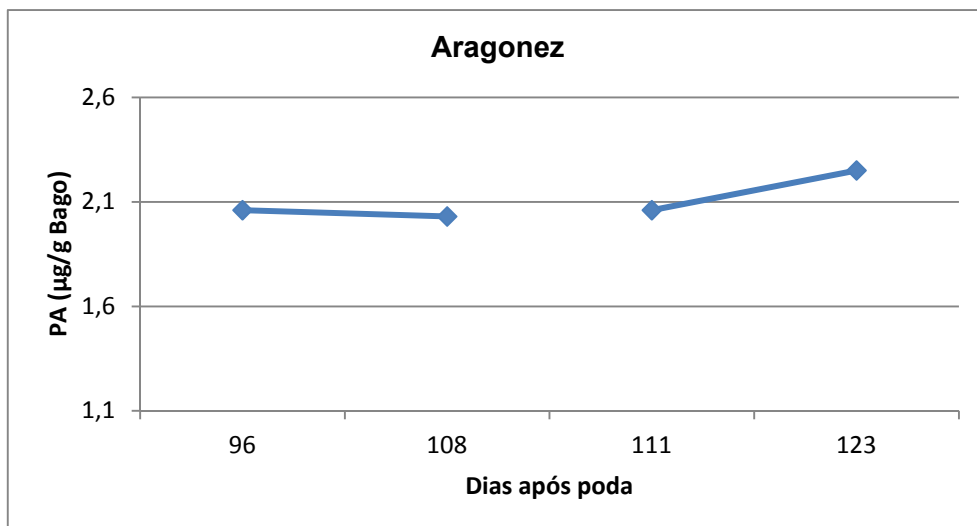


Imagem 20 - Evolução da fracção procianidica (µg/g bago) na casta Aragonez, amostra com 96 e 108 dias após poda pertencem ao talhão 803, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

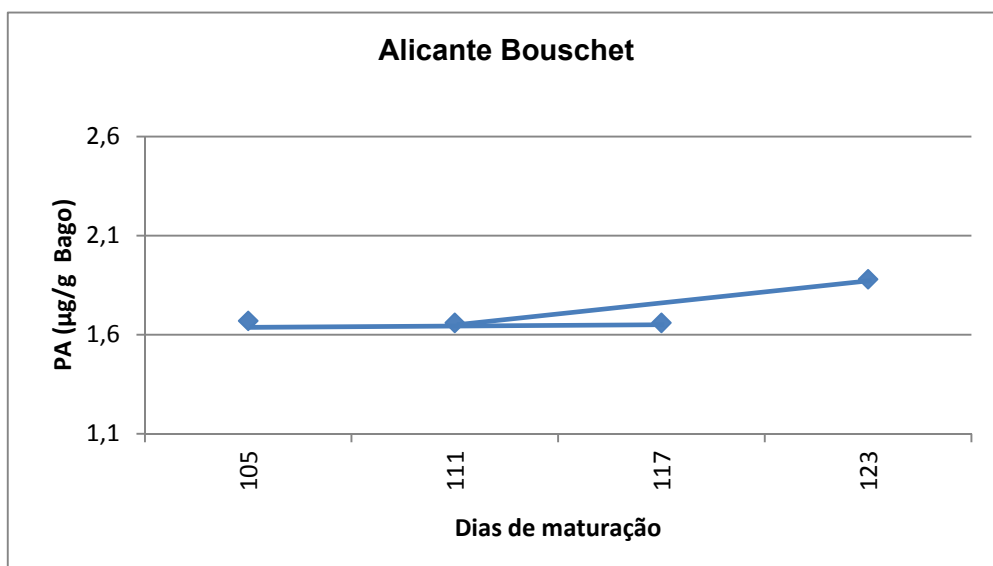


Imagem 21 – Evolução da fracção procianidica (µg/g bago) na casta Alicante Bouschet, amostra com 105 e 117 dias após poda pertencem ao talhão 805, amostra com 111 e 123 pertencem ao talhão 804

No caso da percentagem de galatos a casta Cabernet Sauvignon tem o comportamento contrário ao esperado, aumentando em cada talhão entre a primeira e a segunda recolha de amostras. Também com um comportamento anómalo temos a casta Aragonez no talhão 803 em que a percentagem de galatos não se altera. No entanto de acordo com o esperado o talhão 804 (Aragonez) ocorre um decréscimo entre a primeira e a segunda recolha de amostras. Na casta Alicante Bouschet ocorre também um decréscimo da percentagem de galatos presentes nas amostras retiradas ao longo do processo entre poda e recolha de amostras, podemos assim concluir que as anomalias verificadas na casta Cabernet Sauvignon seja efeito da própria casta que é também verificado no que se refere a fracção de procianidinas e que no caso da casta Aragonez no talhão 803 a evolução ainda não se tinha manifestado por ter poucos dias de maturação.

Apenas o talhão 802 da casta Cabernet Sauvignon apresenta uma percentagem de epigalocatequinas diferente de zero, sendo que ocorre um decréscimo entre a primeira e a segunda recolha de amostras, de facto das amostras retiradas com mais dias após poda a percentagem de epigalocatequina irem diminuindo progressivamente até chegar a nula, no entanto valores são demasiado baixos o que se pode explicar com o método utilizado (Carbonneau) , que devido ao menor tempo de extração tem resultados mais baixos .

Relativamente as proantocianidinas totais presentes, ambas as castas Aragonez e Alicante Bouschet apresentam uma evolução positiva em cada talhão, no caso da casta Alicante Bouschet apresenta mesmo uma evolução continua ao longo de todo o período de recolha de amostras tal como era esperado. Na casta Cabernet Sauvignon os resultados apontam para uma diminuição de procianidinas entre a primeira e a segunda data de recolha de amostras em cada talhão. Para as castas Aragonez e Cabernet Sauvignon se virmos o processo de evolução na sua globalidade os resultados não apresentam nenhum padrão de crescimento ou diminuição de procianidinas mas sim valores muito idênticos entre as primeiras e segundas amostras.

É de notar a diferença de comportamentos da casta Cabernet Sauvignon e as castas Aragonez e Alicante Bouschet, podendo esta ser devido ao facto das condições de maturação em que a casta pois relativamente as condições climáticas em todas as castas se encontravam eram idênticas assim como solos, e ambos os talhões se diferenciaram dos restantes (como podemos verificar um padrão de comportamento entre a casta Cabernet Sauvignon comparando com as duas restantes castas).

Quadro 3 – Características das procianidinas das diferentes castas

Casta	Dias de maturação	Gpm	%g	%p	PMm (mole/g)	PA (mg/g bago)
Cabernet Sauv.	89	3,9	30,3	0,042	1306,4	2,35
	101	2,7	57	0,023	1025,9	1,13
	111	3,5	38	0	1211,3	1,56
	123	3	47,9	0	1078,7	1,46
Aragonez	96	3,8	31,1	0	1269,5	2,06
	108	4,3	31,1	0	1420,7	2,03
	111	3,7	32	0	1209,3	2,06
	123	4,1	29,8	0	1348,5	2,25
Alicante Bouschet	105	3,1	40,5	0	1090,1	1,67
	111	3,3	37,8	0	1142,5	1,66
	117	3,5	34,1	0	1181,4	1,66
	123	3,9	33,3	0	1321,4	1,88

- a) Cabernet Sauvignon: roxo – talhão 802 e azul – talhão 804
b) Aragonez: verde – talhão 803 e azul – talhão 804
c) Alicante Bouschet: salmão – talhão 805 e azul – talhão 804

6 - Conclusão

O método escolhido para analisar taninos, antocianinas e precursores de aromas foi o método Carbonneau pois em termos práticos foi mais fácil trabalhar em laboratório apenas com um método ao contrário da utilização de três métodos diferentes, também foi considerado que no caso do estudo de uma evolução de valores ao longo da maturação e não da quantidade presente nas uvas o método Carbonneau é eficaz, também foi tido em conta que o processo de extração é o mais parecido com o processo a que as uvas são sujeitas durante vinificação. Os resultados referentes a procianidinas foram demasiado baixos e nesse caso poderia ser mais eficaz o método brouzeix no entanto a evolução deste factor consegue ser avaliada (que era o principal objetivo).

Os objectivos deste trabalho não foram totalmente alcançados, pois a recolha de amostras inicialmente programada foi impossibilitada por razões meteorológicas, sendo o universo de amostras bastante inferior ao esperado.

No entanto pode observar-se que os resultados nem sempre foram os esperados, verificando-se diferenças comportamentais nos talhões que foram devido a vários factores e a conjugação de todos eles.

O período de maturação deve ser observado e o momento em que cada factor interfere na evolução (como por exemplo um período de chuva ou de calor mais intenso) também pode alterar os resultados. as diferentes datas das podas para cada casta sujeita teve consequências ao longo da maturação alterando valores esperados e trazendo maior ou menor qualidade (conforme a casta e interferência de factores meteorológicos) para o resultado final, o vinho. Muitas das alterações não esperadas foram causadas pelo factor clima que diminuiu a velocidade e capacidade para maturação e também quanto mais elevado o estado de maturação maior seria o efeito causado pelo mesmo factor.

Outro factor a ter importância nestes resultados são as diferenças a nível de técnicas vitícolas que demonstraram também interferir nas amostras analisadas, como o caso de diferentes sistemas de condução, sendo o monopiano retombante mais indicado visto que pode proteger mais a planta de exposição solar que já muito grande nesta região também podemos observar diferenças provocadas por diferentes clones ou porta-enxertos.

Bibliografia

Allen, M.S., Lacey, M.J. (1993). Methoxypyrazine grape flavor: Influence of climate, cultivar and viticulture. *Wein Wiss* 48, 211-213

Amrani-Joutei, K. (1993). *Thèse de Doctorat Oenologie-Ampélogie*. Bourdeaux: Université de Bourdeaux II.

Andrades, M. G.-S. (1995). Influencia Climatica en la maduracion da la uva de vinificacion: estudio de cultivares de la Rioja y en Madrid. *Zubia Monografico*, 7 , 79-102.

Arnold, R. A., Noble, A.C., Singleton, V.L. (1980) Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine . *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 28 , 675.

Bakker, J., & Timberlake, C. (1985). The distribution of anthocyanins in grape skin extrates of Port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *Journal Science of Food and Agriculture* , 28-31.

Bayonove, C. (2009). L'arôme variétal: le potentiel aromatique du raisin. In M. Moreno-Arribas, & M. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.

Belancic, A., Agosin, E., Ibacache, A., Bordeu, E., Baumes, R., Razungles, A., et al. (1997). Influence of sun exposure on the aromatic composition of chilean Muscat grape cultivars Moscatel de Alejandria and Moscatel rosada. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 181-186.

Bergqvist, J., Dokoozlian, N., Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 1-7. Davis

Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N. (1986). Etude des catéchines et des procyanidols de la grape de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne. *Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin*, 59 , 669-670; 1171- 1254.

Bravdo, B.-A., Hepner, Y. (1987). Irrigation management and fertirrigation to optimize grape composition and vine performance. Proceedings of the Symposium on grapevine canopy and vigor management. *Acta Hort.* 206, 49-67

Bureau, S. (1998). *Modification de l'environnement limineux des grappes et des ceps de vigne: effets sur le potintiel aromatique des baies de Syrah et de Muscat de Frontignan - Doctoral Dissertation*. Montpellier: University of Montpellier II.

Buttrose, M., & Hale, C. (1971). Effects of temperature on accumulation of starch or lipid in chloroplasts of grapevine. *Planta* , 166-170.

Cai, K. H. (2006). Decreased Polyphenol Transport Across Cultured Intestinal Cells by a Salivary Proline-Rich Protein. *Biochemical Pharmacology*, 71 , 15 - 18.

Caldwell, M.M., Bornman, J.F., Ballare, C.L., Flint, S.D., Kulandaivelu, G. (2007). Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6, 252-266 In: Orduña (2010)

Carbonneau, A. (1998). Traité d'irrigation, aspects qualitatifs de la vigne. Lavoisier, Paris

Carbonneau, A., Champagnol, F. (1993). Nouveaux systèmes de culture intégré du vignoble. *Programme AIR-3-CT 93*

Cardoso, A.D. (2007). O vinho da uva à garrafa. Âncora Editora

Cheynier V., R. J. (1990). Most Browning in Relation to the Behaviour of Phenolic Compounds During Oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 , 346 - 349.

Cheynier, V. H.-A. (1997). Estimation of the Oxidative Changes in Phenolic Compounds of Carignane During Winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 , 225 - 228.

Cholet, C. D. (2004). Evolution of the Contents in Soluble Phenolic Compounds, in: Proanthocyanic tanins and in anthocyanins of Shot Grape Berries of *Vitis Vinifera* L. During Their Development. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 38 , 171 - 180.

Cohen, S. D., Tarara, J., & Kennedy, J. (2008). Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Analytica Chimica Acta* , 57-67.

Combe, B. (1987). Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Proceedings of the symposium on grapevine canopy and vigor management*, (pp. 23-35).

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.-C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1, 1-22

Conradie, W., Carey, V., Bonnardot, V., Saayman, D., & Schoor van, L. (2002). Effect of different environmental factors on the performance of Sauvignon Blanc grapevines in the Stellenbosch/Durbanville districts of South African. *South African Journal Enology and Viticulture* , 23, 78-91.

Corrales, M. G. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90 , 415-421.

Corrales, M. T. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food science and Emerging technologies*, 9 , 85-91.

Costanza, P., Tisseyre, B., Hunter, J.J., Deloire, A. (2004). Shoot development and non-destructive determination of grapevine (*Vitis Vinefera L.*) leaf area. *South African Journal Enology and Viticulture* 25, 43-47

Crippen, D., & Morrison, J. (1986). The effects of sun exposure on the phenolic content of Cabernet Sauvignon berries during development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 243-247.

Curvelo-Garcia, A.S. (1988). Controlo de qualidade dos vinhos – Química Enológica. Métodos analíticos IVV (ed). Lisboa

Czochanska, Z., Foo, L., & Porter, L. (1979). Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry* , 1819-1822.

Darné. (1991).

Darné, G. (1988). Évolution des différentes anthocyanes des pellicules de Cabernet Sauvignon au cours du développement des baies. *Conn. vigne vin* , 225-231.

Delgado-Vargas, F. P.-L. (2002). *Natural Colorants for food and Nutritional uses*. New York, USA: CRC Press.

del Rio, J., & Kennedy, J. (2006). Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv Pinot Noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and viticulture*, 57, 125-132.

Downey, M., Dokoozlian, N., & Krstic, M. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 257-268.

Dumazert, G., Margulis, H., Montreau, F.R. (1973). Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation d'un *Vitis vinifera* blanc: le Mauzac. *Ann. Technol. Agric.* 22, 137-151

Dumon, M.C., Michaux, J., Masquelier, J. (1991). Dosages des procyanidols des pépins de raisin de cépages rouges et blancs du bordelais. *Bull OIV* 725-726, 533-542

Du-Plessis, C. (1984). Optimum maturity and quality parameters in grapes: a review. *South Africa journal of enology and viticulture*, 5 , 35-42.

Escribano - Bailon, T. A.-G.-G.-B. (2001). Color and Stability of Pigments Derived of Acetaldehydemediated Condensation Between Malvidin 3-O-Glucosid and (+)-catechin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49 , 1213 - 1217.

Escribano-Bailón, T. G.-F.-G.-B. (1992). *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 40, 1794-1799.

Esteban, M. V. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis Vinifera* L) grape berries during ripening. *Journal of the science of food and agriculture*, 81 , 409-420.

Ewart, A., & Kliewer, W. (1977). Effects of controlled day and night temperatures and nitrogen on fruit-set, ovule fertility, and fruit composition of several wine grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 88-95.

Favero, G., Botrè, F., Mazzei, F. (2007). Peroxidase based biosensors for the selective determination of D, L-Lactic acid and L-Malic acid in wines. *Microchemical Journal* 87, 81-86

Fernandez, P., Cacho, J., Ferreira, V., Castells, J.E. (1992). Evolution of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the tempranillo, Moristel and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 244-248

Flanzy, M., Bourzeix, M., Heredia, N., & Dubernet, M. (1972). La teneur et la repartition des divers composés phénoliques dans le raisin et la rafle de douze cépages. *C.R. Acad. Agric.* , 452-460.

Flora, L. (1978). Influence of heat, cultivar and maturity on the anthocyanidin 3,5-diglucosides of muscadine grapes. *Journal Food Science* , 1819-1821.

Fountoin, H., Saucier, C., Teissedre, P-L, Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food quality and Preference*, 19 , 286-291.

Fournand, D., Vicens, A., Sidnoum, L., Soiuquet, J.M., Moutounet, M., Cheynier, V. (2006). Accumulation and Extractability of Grape Skin Tannins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54 , 7331 - 7338.

Freitas, V. G. (1998). Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*, 49 , 1435-1441.

Freitas, V. (1995). *Thèse de Doctorat Oenologie-Ampélogie*. Bordeaux: Université de Bordeaux II.

Fregoni, C., Pezzuto, S. (2000). Principes et premières aproches de l'indice bioclimatique et qualité de fregoni. *Progr. Agric. Vitic.* 18, 390-396

Fuleki, T. d. (1997). Catechin and procyanidin composicion of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 45 , 1156-1160.

Geny, L., Saucier, V., Bracco, S., Daviaud, F., & Glories, Y. (2003). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51 , 8051.

Gerbi, V. Z. (2002). *Evoluzione delle Antocianine nel corso della vinificazione delle uve nebbiolo*. Pinerolo: Chiriotti Editori ed.

Glories, Y. (1998). Les Tanins du raisin et du vin. *Rev. Franc. Oenol.* , 14-16.

Goldberg, H., Karumanchi, A., Tsang, E., & Soleas, G. (1998). Catechin and epicatechin concentration of red wines: regional and cultivar- related diferences. *American Journal of Enology and Viticulture* , 23-33.

González-Sanjosé, M., Barren, L.J.R., Junquera, B., Robredo, L.M. (1991). Application of principal component analysis to rippening indices for wine grapes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 4 , 245-255.

González-Sanjosé, M. (1993). Caracterizacion varietal en funcion de la composicion de la uva: analisis discriminante. *Agrochimica*, XXXVII , 86-92.

Gu, L. K. (2003). Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation . *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 51 , 7513-7521.

Guedes de Pinho, P., Silva Ferreira, A., Mendes Pinto, M., Gomez Benietz, J., & Hogg, T. (2001). Determination of carotenoid profiles in grapes, musts and fortified wines from Douro varieties of *Vitis vinifera*. *Journal Agriculture food Chemistry* , 49, 5484-5488.

Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape seeds extract: correlation with antiradical activity. *Food Chemistry* , 100, 1-9.

Guerra, C., Vivas, N.G., Nonier, M.-F., Vivas, N. (2001). Anthocyanin in grape skins during maturation of *vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot Noir from different Bordeaux terroirs. *Journal International Science Vigne Vin* 35, 149-156

Guilloux, M. (1981). *Thèse de 3ème Cycle. Bourdeaux: Université de Bourdeaux II.*

Hale, C. (1988). Interaction between temperature and potassium and grape acids. *CSIRO division of horticultural research report* (pp. 87-88). Glen Osmond, South Australia: CSIRO.

Hale, C. (1977). Relation between potassium and malate and tartrate contents of grape berries. *Vitis* , 9-19.

Hale, C., & Buttrick, M. (1974). Effect of temperature on ontogeny of berries of *vitis vinifera* L cv. Cabernet Sauvignon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* , 390-394.

Harbertson, J.F., Roby, G., Adams, D.A., Mathews, M.A. (2004). Berry size and Vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10, 100-107

Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in Flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504

Hrazdina, G., Parsons, G. F., & Mattick, L. R. (1984). Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Journal Enology and Viticulture* , 35:220.

Huglin, P., & Schneider, C. (1998). *Biologie et écologie de la vigne*. Paris: Lavoisier.

J.J. Macheix, A. F. (1990). *Fruit Phenolics*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.

Jackson, D., & Cherry, N. (1988). Prediction of a district's graperipening capacity, using a latitude-temperature index. *American Journal Enology and Viticulture* , 39, 19-28.

Jackson, D.L., Lombard, P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality review. *American Journal of Enology and Viticulture* 4, 409-430

Jackson, R. S. (2008). *Wine Science - Principles and Applications*. Academic Press.

Jonnes, G. D. (2000). Climatic influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *American journal of enology and viticulture*, 51 , 249-261.

Jordão, A. (1996). *Evolução das antocianinas e Procianidinas ao longo da Maturação de uvas Tintas das castas Periquita e Touriga Francesa: Incidência da prática da rega*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa .

Kelebek, H. C. (2006). Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis Vinifera* L. cvs. Bogazkere and Okuzgozu. *Journal of Food Engineering*, 77 , 1012-1017.

Keller, M. (2009). Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 1-14.

Keller, M. (2010). *The science of grapevines: anatomy and physiology*. New York: Academic Press.

Kennedy, J. M. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55 , 77-85.

Kliewer, V., & Torres, R. (1972). Effect of controlled day and night temperatures on grape coloration. *American Journal Enology Viticulture* , 71-77.

Kliewer, W.M., Lider, L.A. (1970). Effect of day temperature and light intensity on growth and composition of *Vitis Vinifera* L. fruits. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 18, 42-54

Kliewer, W., & Schultz, H. (1973). Effect of sprinkler cooling of grapevines on fruit growth and composition. *Am. J. Enol. Vitic.* , 17-26.

Kliewer, W.M. (1977). Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 28, 96-103

Koblet, W., Zanier, C., Tanner, H., Vautier, P., Simon, J., & Gnägi, F. (2010). Reifeverlauf von Sonnen und Schattentrauben. In R. Orduña, *Climate Change associated effects on grape and wine quality and production* (pp. 1844-1855). Food Research International.

Kondo, K. K. (2000). Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-Type: Evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Letters*, 41 , 485-488.

Koshita, N., Yamane, T., Jeong, S.T., Goto-Yamanoto, N., Kobayashi, S. (2006). Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 54-59

- Kriedemann, P., & Smart, R. (1971). Effect of irradiance, temperature and leaf water potential on photosynthesis of vine leaves. *Photosynthetica* , 6-15.
- Lacey, M.J., Allen, M.S., Harris, R.L.N., Brown, W.V. (1991) Methoxypyrazines in Sauvignon Blanc grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 103-108
- Lea, A. (1990). In L. Russel, *Bitterness in Food and Beverages* (p. 123). Amsterdam: Elsevier.
- Lee, E., Walter, A.R., Boss, J., McDavid, D.A.J., Thomas, J.R., Robinson, S.P. (2007). *Plant Journal* 49, 772 *In: Cohen et al* (2008)
- Lucena, A. N.-F. (2010). Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 , 30-36.
- Marais, J., Van Wyk, C., & Rapp, A. (2009). Carotenoids in Grapes. In M. Moreno-Arribas, & M. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.
- Marais, J., Versini, G., Van Wyk, C., & Rapp, A. (1992). Effect of region on free and bound monoterpene and C-13-norisoprenoid concentrations in Weisser Riesling wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 71-77.
- Maujean, A., Brun, O., Vesselle, G., Bureau, G., Boucher, J. M., Coisin, M., et al. (1983). Investigations on grapevine maturation in the Champagne region: Method of forecasting the harvesting date, *Vitis*, 22 , 137-150.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). Anthocyanins. In *Fruits, Vegetables and Grains*. CRC Press.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47 , 4009-4017.
- Mérout, I., Seguin, G., Arrouays, D. (1998). Les sols et l'alimentation hydrique et croissance de la vigne en 1995. *Journal International Science Vigne Vin*, 32, 59-68
- Montealegre, R., Peces, R., Gascueña, J., Vozmediano, J., & Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis Vinifera* varieties grown in warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 , 687-693.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.

Moutounet, M., Rigaud, J., Souquet, J.M., Cheyneir, V. (1996). Caractérisation structurale des tannins de la baie de raisin Quelques exemples de l'incidence du cépage, du terroir et du mode de conduite de la vigne. *Bull OIV* 738-784, 433-443

Mori, K., Sugaya, S., Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature conditions. *Scientia Horticulturae* 105, 319-330

Muñoz, S. M. (2008). Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD. Validation Study and response comparison of different standards. *Analytic Chimica Acta*, 628 , 104-110.

Navarre, C. (1997). *Enologia, Técnicas de produção de vinho*. Publicações Europa-América.

Nawaz, H. S. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and purification technology*, 48 , 176-181.

Orduña, R. M. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International* , 43, 1844-1855.

Ortega - Regules, A. R.-C.-G.-R.-P. (2006). A First Approach Towards the Relationship Between Grapes Skin Cell Wall Composition and Antocyanin Extrability. *Analytica Chimica Acta*, 563 , 26 - 32.

Palacios, J. C. (1986). Evolucion de la maduración e índices de madurez en vides de la Rioja . *I.E.R.*, 8 .

Palma, M. T. (1999). Extraction of polyphenolic compounds from grape seededs with near critical carbon dioxide. *Journal of chromatography A*, 849 , 117-124.

Passos, C. C. (2007). Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. *Food Chemistry*, 105 , 1457-1467.

Perez-Magarino, S. G.-S. (2004). Evolution of Flavanols, Antocyanins and Their Derivatives During the Aging of Red Wines Elaborated From Grapes Harvested at Different Stages of Ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52 , 1181 - 1189.

Perez-Magariño, S. G.-S. (2002). Physico-chemical parameters justifying the vintage qualification in wines from Spanish Protected Designation of Origin . *European food research and technology*, 214 , 444-448.

Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. (2006). Polyphenols and color variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96 , 197-208.

Peynaud, E. (1989). *Enologia Pratica*. Madrid: Mundi-prensa.

Pinto, F. M. (2002). *Caracterização fenólica das castas, tinta roriz, touriga francesa e touriga nacional, produzidas na região do Douro: estudo ao longo da maturação, maceração fermentativa e conservação*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.

Razungles, A., Bayonove, C., Cordonnier, R., & Baumes, R. (1987). Etude des caroténoides du raisin á maturité. *Vitis* , 183-191.

Regina, M.A., Amorim, D.A., Favero, A.C., Mota, R.V., Rodrigues, D.J. (2006). Novos polos vitícolas para produção de vinhos finos em Minas Gerais. Informe Agropecuario Belo Horizonte 234, 111-118

Reynier, A. (1986). *Manual de viticultura*. Publicações Europa-América.

Reynolds, A., & Wardle, D. (1993). Significance of viticultural and enological practices on monoterpene flavorants of British Columbia - grown *Vitis vinifera* berries and juices. *Wien Wissenschaft*, 194 -202.

Ricardo da Silva, J.M. (1995). Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho, efeitos potenciais na saúde. Actas do 3º Simpósio de Viticultura do Alentejo, Vol 2, 343-356. Évora

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau, P., Sudraud, P. (1972). *Traité d'Oenologie*. Dunod, Paris

Ribéreau-Gayon, P. (1982). The anthocyanins of grapes and wines. Anthocyanins as food colors. Markakis, P. London, Academic Press Inc: 209 - 244

Ribéreau-Gayon, P. G. (1986). Phenolics in grapes and wine. *Proceedings of the sixth Australian wine industry technical conference* (pp. 247-256). Adelaide, South Australia: Terry Lee.

Ribéreau-Gayon, P. (1965). Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis Vinifera*. *L.C.R. Acad.Sci.* , 341.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y. (1980). Structure of condensed phenolic compounds in *Vitis Vinifera* grapes and wines Influence of ripening and infection by *Botrytis Cinera* on phenolic content. *American Journal of Enology and Viticulture* 31, 228-234

Ribéreau-Gayon, P. (1965). Identification des esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis Vinifera*. *L.C.R. Acad. Sci.* , 341.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, P., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, Volume 2 - The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. West Sussex, England: John Wiley and Sons, Ltd.

Robredo, L. J.-S. (1991). Biochemical events during ripening of grape berries. *Italian journal of food science*, 3 , 173-180.

Roggero, J.P., Coen, S., Ragonnet, B. (1986). High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah (An approach to anthocyanin metabolism). *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 77-83

Romero, E.G., Gascueña, J.M., Vozmediano, J.L.C., Peces, R.R., Montealegre, R.R. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis Vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food composition and Analysis* 19, 687-693

Romeyer, E.M., Macheix, J., Sapis, J.C. (1986). Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry*, 25, 219-221

Rosier, J.P., Revel, G., Falcão, L.D., Bordignon-Luiz, M.T. (2006). Aroma Impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection frequency analysis (GC-olfactometry). *Food Chemistry* 107 (2008), 497-505

Ruffner, H., Hawker, J., & Hale, C. (1976). Temperature and enzymic control of malate metabolism in berries of *vitis vinifera* . *Phytochemistry* , 1877-1880.

Ryona, I., Pan, B.S., Intrigliolo, D.S., Lakso, A.N., Sacks, G.L. (2008). Effects of cluster light exposure on 3- isobutyl-2-methoxypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (*vitis vinifera* L. cv Cabernet Franc). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10838-10846

Santos-Buelga, C. F.-A.-B. (1995). Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry*, 53 , 197-201.

- Sevinate Pinto, F.M.L. (2002). Caracterização fenólica das castas, Tinta Roriz, Touriga Francesa e Touriga Nacional, produzidas na região do Douro: Estudo ao Longo da maturação, maceração fermentativa e conservação. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa
- Seguin, G. (1983). Influence des terroirs viticoles sur la constitution et la qualité des vendanges. *Bull OIV* 623, 3-18
- Sigler, J. (2010). In den Zeiten des Klimawandels: Von der Sübreserve zur Sauerreserve? In R. Orduña, *Climate change associated effects on grape and wine quality and production* (pp. 1844-1855). Food Research International, 43
- Singleton, V.L., Esau, P., (1969). Phenolic substances in grapes and wine and their significance. *Adv. Food Res. Supp.* 1, 112-133
- Singleton, V.L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in must, wines and model systems, observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 69-77
- Singleton, V. (1980). Grape and Wine Phenolics: background and prospects. *Proceedings of Grape and Wine Cent. Symp* (pp. 215-227). Davis: University of California.
- Souquet, J., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Oligomeric and polymeric tannins from grape skin. *Proceedings of the 18 International Conference of group Polyphenols*, (pp. 249-250).
- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L., Fergunson, J.C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis Vinifera* cv Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 53 (3) 171-182
- Susana Río Segade, L. R. (2008). Phenolic ripness assessment of grape skin by texture analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* , 644 - 649.
- Tarara, J., Lee, J., Spayd, S., & Scagel, C. (2008). Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* , 59, 235-27.
- Teixeira, A., Bastiaanssen, W., & Bassoi, L. (2007). Crop water parameters of irrigated wine and table grapes to support water productivity analysis in the São Francisco river basin, Brazil. *Agricultural water management* , 31-42.

Tomana, T., Utsummiya, N., Dataoka, I. (1979). The effect of environmental temperatures on fruit on ripening on the tree II, the effect of temperatures around whole vines and clusters on the coloration of Kyoho grapes. *Journal Japanese Society Horticulture Science*, 48 261-266

Tonietto, J., & Carbonneau, A. (2004). A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agricultural and Forest Meteorology*, 81-97.

Tonietto, J., Carbonneau, A. (1999). Análise mundial do clima das regiões vitícolas e da sua influencia sobre a tipicidade dos vinhos; a posição da viticultura brasileira comparada com 100 regiões em 30 países. Anais do Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, pp 75-90 *In: Tonietto e Carbonneau (2004)*

Williams, L., & Biscay, P. (1991). Partitioning of dry-weight, nitrogen, and potassium in Cabernet Sauvignon grapevines from anthesis until harvest. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 113-117.

Williams, P., Cynkar, W., Francis, I., Gray, J., Iland, P., Coombe, B. (1995). Quantification of Glycosides in Grapes, Juices, and Wines through a Determination of Glycosyl Glucose. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 121-128

Anexos

Anexo 1

Plano de Trabalho, enviado para Vitivinícola Santa Maria (Grupo Vinibrasil)

Objectivos:

Pretende-se compreender a evolução das características físico-químicas da uva em zonas tropicais, assim foram escolhidos 2 lotes, de cada uma de 3 castas diferentes, em estados de maturação diferente. Para esse efeito de cada lote vai ser recolhida uma amostra homogénea todas as semanas durante o período de maturação entre pintor e vindima (e duas semanas após cada vindima).

Material:

Castas:

- Aragonéz (600 bagos de diferentes cachos, 300 por lote)
- Cabernet Sauvignon (600 bagos de diferentes cachos, 300 por lote)
- Alicante Bouschet (600 bagos de diferentes cachos, 300 por lote)

Procedimento:

De forma a poder ter amostras referentes aos diferentes estados de maturação propõe-se a recolha de bagos todas as semanas, de cada lote que se encontre entre o estado de pintor e a vindima, também é necessário que se recolha amostras 2 semanas após vindima para que se possa avaliar os bagos sujeitos a sobrematuração. Assim através das datas de poda e das previsões de pintor indicadas apresentamos as datas de colheita das amostras dos respectivos lotes.

Calendário das colheitas:

				Datas de colheita								
Casta	Lote	Poda (*)	Pintor (*)	26-04	03-05	10-05	17-05	24-05	31-05	07-06	14-06	21-06
Cabernet Sauv.	802	03-02	13-05			X	X	X	X	Vindima		X
	804	12-01	22-04	X	X	Vindima		X				
Alicante Bousc.	804	12-01	22-04	X	X	Vindima		X				
	805	18-01	28-04	X	X	X	Vindima		X			
Aragonez	803	27-01	10-05			X	X	Vindima		X		
	804	12-01	22-04	X	X	Vindima		X				

*datas auxiliares para estimativa das datas de colheita

Processo de recolha das amostras:

De cada lote é necessário recolher amostras homogéneas para que também os resultados possam ser o mais fidedignos possíveis.

- Os bagos devem ser retirados de forma a manterem o pedicelo.
- A película dos bagos recolhidos deve encontrar-se intacta sem nenhuma parte da polpa exposta, tendo particular atenção a este factor durante todo o processo de recolha e manuseamento dos bagos.
- Recolha de 5 bagos por cacho, alternando em cada cacho as zonas de corte. A recolha de bagos terá de ser feita em zonas variadas, i.e, devem se retirados bagos da parte de baixo num cacho, noutro cacho retirar da parte de cima e noutro caho retirar do meio.
- É necessário também ter em atenção as zonas do cacho expostas ao sol ou à sombra, recolhendo bagos de ambas.
- Os cahos devem ser representativos das diferentes áreas do lote, sendo por isso aconselhado escolher 10 linhas ao longo do lote e ao longo de cada uma dessas linhas recolher 6 cachos, de forma a obter uma amostra de 300 bagos por cada lote mais representativa de todo o terreno.

Anexo 2

Pesagens e volumes das amostras recebidas

03-05-2010

	Cabernet Sauv.		Aragonez		Alicante Bous.	
	802	804	803	804	804	805
Peso	87,9	91,1	137,9	154,6	173,5	153,4
Volume	57	52	84	95	108	100

15-05-2010

	Cabernet Sauv.		Aragonez		Alicante Bous.	
	802	804	803	804	804	805
Peso	92,9	91	119,5	141,2	167,1	192,1
Volume	56	58	74	90	110	111

Anexo 3

Leitura de Antocianas em mg/L (e μM / L de Vinho - valor necessário aos cálculos de GG)

03-05-2010

AMOSTRA	A HCl	A SO ₂	mg/L	μM / Vinho
CS 802	0,233	0,041	462,5	1008,7
CS 802	0,267	0,043	530,7	1157,6
CS 804	0,365	0,064	724,5	1580,2
CS 804	0,329	0,058	653,0	1424,2
Ar 803	0,905	0,195	1789,1	3902,2
Ar 803	0,897	0,183	1775,3	3872,1
Ar 804	0,416	0,152	809,9	1766,5
Ar 804	0,409	0,145	797,2	1738,7
AB 804	0,667	0,153	1316,7	2871,9
AB 804	0,768	0,153	1520,8	3316,9
AB 805	0,665	0,146	1314,1	2866,1
AB 805	0,756	0,146	1497,9	3267,1

15-05-2010

AMOSTRA	A HCl	A SO ₂	mg/L	μM / Vinho
CS 802	0,383	0,076	758,5	1654,3
CS 802	0,433	0,076	859,5	1874,5
CS 804	0,359	0,074	710,4	1549,4
CS 804	0,390	0,074	773,0	1686,0
Ar 803	0,929	0,260	1824,6	3979,5
Ar 803	0,904	0,260	1774,1	3869,4
Ar 804	0,501	0,124	987,2	2153,2
Ar 804	0,410	0,124	803,4	1752,3
AB 804	0,645	0,239	1255,1	2737,5
AB 804	0,768	0,239	1503,6	3279,4
AB 805	0,645	0,202	1262,5	2753,6
AB 805	0,735	0,202	1444,3	3150,1

Cálculos:

- $\text{mg/L} = 20 \times (A_{\text{HCL}} \times 101 - A_{\text{SO}_2} \times 10)$
- $\mu\text{M} = (\text{mg/L} / 0,493) / 0,93$
- Para comparação de métodos efectuou-se também os seguintes cálculos:
 $(\text{mg/L} \times \text{volume da amostra mL} / 1000) / \text{Peso inicial da amostra} = \text{mg/gr de bago}$

Anexo 4

03-05-2010

Leituras de GG total

	Amostra Hidrolizada		Leitura			Controlo		Leitura			Vinho Ggtotal
AMOSTRA	A5min	A20min		μM		A5min	A20min		μM		μM
CS 802	0,413	1,141	0,728	931,60		0,303	0,474	0,171	137,250		2271,6
CS 802	0,440	1,222	0,782	1003,60		0,395	0,458	0,063	47,250		2734,9
CS 804	0,368	1,112	0,744	952,93		0,312	0,329	0,017	8,917		2699,7
CS 804	0,400	1,023	0,623	791,60		0,348	0,364	0,016	8,083		2240,7
Ar 803	0,397	1,706	1,309	1706,27		0,304	0,363	0,059	43,917		4753,9
Ar 803	0,282	1,523	1,241	1615,60		0,301	0,344	0,043	30,583		4532,8
Ar 804	0,340	1,119	0,779	999,60		0,240	0,290	0,05	36,417		2754,5
Ar 804	0,344	1,167	0,823	1058,27		0,297	0,341	0,044	31,417		2936,5
AB 804	0,209	0,956	0,747	956,93		0,120	0,136	0,016	8,083		2713,5
AB 804	0,263	1,312	1,049	1359,60		0,147	0,167	0,02	11,417		3855,5
AB 805	0,208	1,611	1,403	1831,60		0,154	0,172	0,018	9,750		5210,0
AB 805	0,201	1,635	1,434	1872,93		0,210	0,237	0,027	17,250		5306,8

Valores de GG total, Anoticianas e GG Final (sem interferença de antocianas)

AMOSTRA	μM GG total	μM Antoc.	μM GG
CS 802	2271,6	1008,7	1263,0
CS 802	2734,9	1157,6	1577,3
CS 804	2699,7	1580,2	1119,5
CS 804	2240,7	1424,2	816,5
Ar 803	4753,9	3902,2	851,8
Ar 803	4532,8	3872,1	660,6
Ar 804	2754,5	1766,5	988,0
Ar 804	2936,5	1738,7	1197,8
AB 804	2713,5	2871,9	-158,4
AB 804	3855,5	3316,9	538,6
AB 805	5210,0	2866,1	2343,9
AB 805	5306,8	3267,1	2039,7

05-05-2010

Leituras de GG total

AMOSTRA	Amostra Hidrolizada		Leitura			Controlo		Leitura			Vinho Ggtotal
	A5min	A20min	A	μM		A5min	A20min	A	μM		μM
CS 802	0,141	1,079	0,938	1211,60		0,091	0,315	0,224	181,417		2946,1
CS 802	0,248	0,994	0,746	955,60		0,098	0,114	0,016	8,083		2709,7
CS 804	0,398	1,235	0,837	1076,93		0,097	0,292	0,195	157,250		2630,1
CS 804	0,432	1,255	0,823	1058,27		0,103	0,297	0,194	156,417		2579,1
Ar 803	0,171	1,661	1,490	1947,60		0,229	0,266	0,037	25,583		5496,5
Ar 803	0,167	1,631	1,464	1912,93		0,159	0,236	0,077	58,917		5302,0
Ar 804	0,241	0,795	0,554	699,60		0,178	0,286	0,108	84,750		1758,3
Ar 804	0,199	0,753	0,554	699,60		0,136	0,188	0,052	38,083		1891,8
AB 804	0,187	1,493	1,306	1702,27		0,243	0,403	0,16	128,083		4501,8
AB 804	0,247	1,548	1,301	1695,60		0,260	0,318	0,058	43,083		4725,8
AB 805	0,233	1,526	1,293	1684,93		0,167	0,216	0,049	35,583		4716,7
AB 805	0,229	1,480	1,251	1628,93		0,131	0,176	0,045	32,250		4566,1

Valores de GG total, Anoticianas e GG Final (sem interferença de antocianas)

AMOSTRA	μM GG total	μM Antoc.	μM GG
CS 802	2946,1	1654,3	1291,8
CS 802	2709,7	1874,5	835,1
CS 804	2630,1	1549,4	1080,7
CS 804	2579,1	1686,0	893,1
Ar 803	5496,5	3979,5	1517,0
Ar 803	5302,0	3869,4	1432,6
Ar 804	1758,3	2153,2	-394,9
Ar 804	1891,8	1752,3	139,5
AB 804	4501,8	2737,5	1764,3
AB 804	4725,8	3279,4	1446,4
AB 805	4716,7	2753,6	1963,1
AB 805	4566,1	3150,1	1416,0

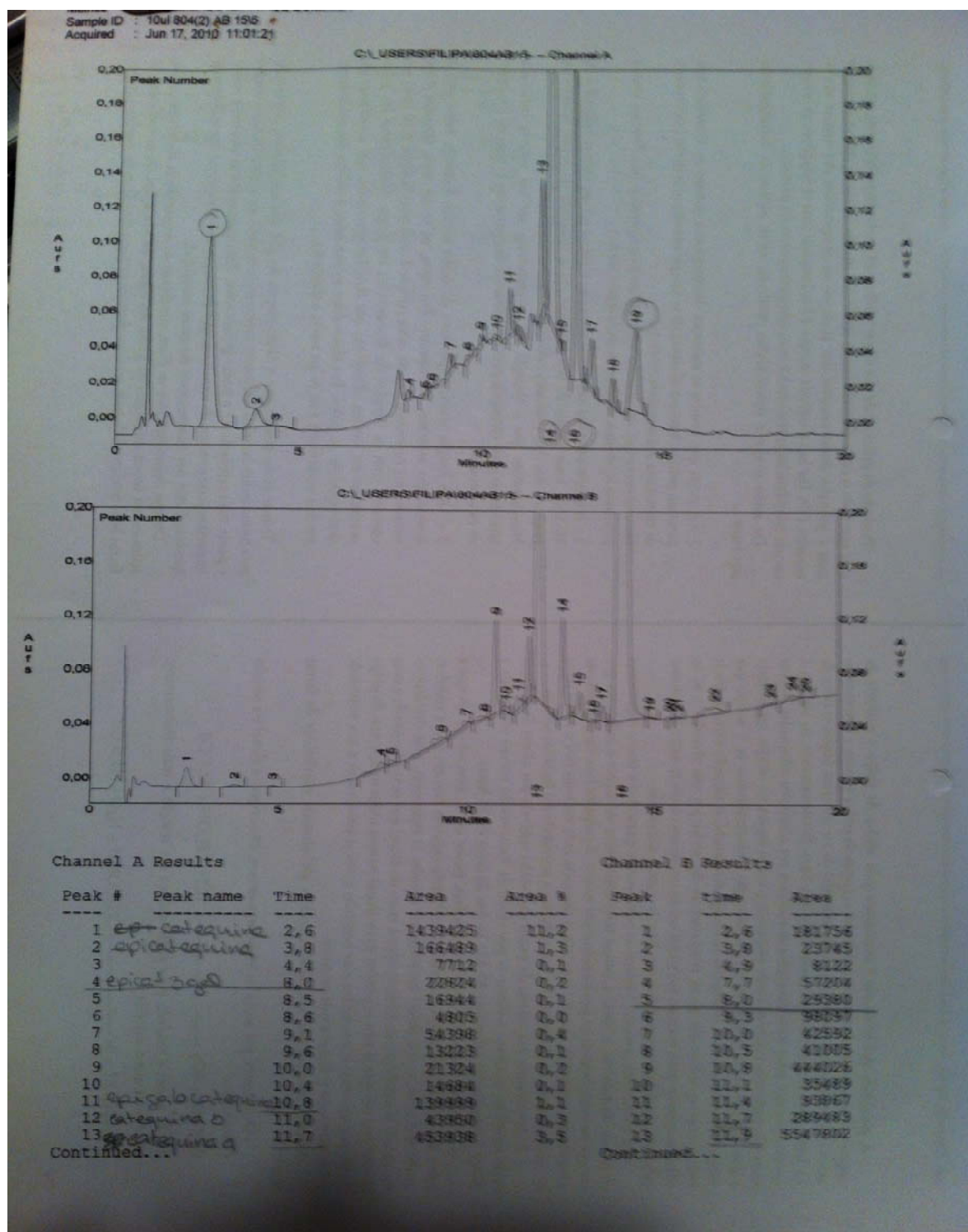
Cálculos:

- $A = A_{5\text{min}} - A_{20\text{min}}$
- $\mu\text{M Amostra Hidrolizada} = ((A_{\text{Amostra Hidrolizada}} - 0,0293) / 0,0015) \times 2$
- $\mu\text{M Controlo} = ((A_{\text{Controlo}} - 0,0063) / 0,0024) \times 2$
- $\mu\text{M GG Total} = ((\mu\text{M Amostra Hidrolizada} - \mu\text{M Controlo}) \times 2,5) / (0,93 \times 0,94)$
- Para comparação de métodos efectuou-se também os seguintes cálculos:

$(\mu\text{M GG Total} \times \text{volume da amostra mL} / 1000) / \text{Peso inicial da amostra} = \mu\text{mol PA} / \text{gr de bago}$

Anexo 5

Cromatograma obtido através de leitura HPLC



Anexo 6

Resultados das leituras de Tiolise por HPLC:

Amostras de dia 03-05-2010

	AREA							
Amostras	Catequina	Epicatequina	Epicatequina -3-galato	Epigalocatequina	Catequina A	Catequina B	Epicatequina Benziltioeter	Epicatequina 3-galato benziltioeter
CS 802	1736074	346323	1579449	757509	873118	46393	10331352	3403814
CS 804	1066047	316439	402611	409398	457314	24860	5864396	1483468
Ar 803	1564917	297532	441165	546630	320133	43175	8049338	2283794
Ar 804	1470575	230983	462725	689142	709850	59129	8058065	2219064
AB 804	1322615	257396	344743	224890	505181	57187	5731602	1807453
AB 805	1741271	305602	542503	337417	611004	36604	6168058	2148053

	AREA							
Amostras	Catequina	Epicatequina	Epicatequina -3-galato	Epigalocatequina	Catequina A	Catequina B	Epicatequina Benziltioeter	Epicatequina 3-galato benziltioeter
CS 802	1523959	693288	1261363	316622	522334	11343	9322984	3862624
CS 804	1061195	472971	581420	259549	543849	48497	7097377	2088118
Ar 803	1766934	350745	744329	611421	774722	52633	9242537	3132272
Ar 804	2045162	295684	476429	583818	746375	170869	7996421	1892651
AB 804	1714863	134560	419905	251336	549240	58594	6898157	1518553
AB 805	1194482	184953	230255	219315	390720	0	4817343	1611297

Amostras de dia 15-05-2010

	AREA							
Amostras	Catequina	Epicatequina	Epicatequina -3-galato	Epigalocatequina	Catequina A	Catequina B	Epicatequina Benziltioeter	Epicatequina 3-galato benziltioeter
CS 802	386616	33686	11826	176578	229187	8633	2607316	744900
CS 804	606438	102764		411908	371534	1598	3445485	1165677
Ar 803	1076552	81971	286660	430451	356714	17526	9767418	1539146
Ar 804	1359205	134292	17780	634048	799764	88419	9586966	1790450
AB 804	1439425	166489	22824	139999	453938	43950	8102081	1427085
AB 805	1607441	225017	178972	229437	350403	14605	7997153	1636883

	AREA							
Amostras	Catequina	Epicatequina	Epicatequina -3-galato	Epigalocatequina	Catequina A	Catequina B	Epicatequina Benziltioeter	Epicatequina 3-galato benziltioeter
CS 802	980858	286283		237412	249569	15641	2704582	883825
CS 804	1343227	315585		468409	360897	128341	3943297	1295544
Ar 803	1661340	225597	560825	368250	620066	50943	9137415	1967359
Ar 804	1948435	324607	298286	619018	783198	184641	8722942	1964890
AB 804	1371757	88407	159808	164360	521602	57696	8686404	1573887
AB 805	1810638	247703	285270	257162	481536	45133	7368070	1734839

Cálculos:

- $\text{GPm} = \text{Grau Médio de Polimerização} = \frac{\sum \text{unidades totais}}{\sum \text{unidades terminais}}$
- $\%g = \text{Percentagem de galoitização} = \left(\frac{\sum \text{unidades epicatequina galato}}{\sum \text{unidades totais}} \right) \times 100$
- $\%p = \text{Percentagem de prodelfinidinas} = \left(\frac{\sum \text{unidades epigallocatequina}}{\sum \text{unidades totais}} \right) \times 100$
- $\text{PMm} = \text{Peso Molecular Médio} = \text{GPm} \times (288 + (152 \times \%g/100) + (16 \times \%p/100)) + 2$
- $\text{PA} = \text{Flavonoides Poliméricos} = \text{PMm} \times \sum \text{unidades terminais}$
- Para comparação de métodos efectuou-se também os seguintes cálculos:
 $(\text{PA} \times \text{volume da amostra mL} / 1000) / \text{Peso inicial da amostra} = \text{g/gr de bago}$